

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Medicina
Departamento de Bioquímica

**Establecimiento y caracterización de un modelo *in vitro* de
monocitos humanos infiltrados en tumores**

TESIS DOCTORAL

Alessandra Soares-Schanoski

Madrid, 2008

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Medicina
Departamento de Bioquímica

**Establecimiento y caracterización de un modelo *in vitro* de
monocitos humanos infiltrados en tumores**

Memoria presentada para optar al título de Doctora por la
Universidad Autónoma de Madrid

Alessandra Soares-Schanoski
Licenciada en Biología

Director de tesis:
Dr. Eduardo Manuel López-Collazo

Unidad de Investigación
Hospital Universitario La Paz



Hospital Universitario
La Paz



EDUARDO MANUEL LÓPEZ COLLAZO, DOCTOR EN FARMACIA E
INVESTIGADOR DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL
UNIVERSITARIO LA PAZ,

CERTIFICA

Que el trabajo que presenta Dña. ALESSANDRA SOARES SCHANOSKI, titulado
“Establecimiento y caracterización de un modelo *in vitro* de monocitos humanos
infiltrados en tumores”, ha sido realizado bajo mi dirección y considero que reúne los
requisitos de originalidad y rigor metodológico necesarios para ser presentado como
Memoria de Tesis Doctoral.

Madrid, 1 de Octubre de 2008.

Fdo. Dr. Eduardo Manuel López Collazo

A la memoria de mi hermano Marcos Soares Schanoski

La humanidad necesita hombres y mujeres prácticos, que saquen el mayor provecho de su trabajo y que, sin olvidar el interés general, salvaguarden sus propios intereses. Pero la humanidad también necesita soñadores, para quienes el desarrollo de una tarea sea tan cautivante que les resulte imposible dedicar su atención en su propio beneficio.

Marie Skłodowska-Curie (1867-1934)
Mujer y científica por ello, una revolucionaria para su época.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis y amigo Dr. Eduardo López-Collazo por aceptarme no sólo como su becaria, pero también como su alumna y amiga. Gracias por tener paciencia conmigo en el ámbito laboral y personal. No olvidaré nunca la oportunidad que me has dado y principalmente estos últimos meses de la escritura de la tesis que por unas cosas y otras me han unido más a ti.

A mi ex jefe Dr. Fernando Guimarães por haberme iniciado en la ciencia, por los intercambios científicos y por quererme como si fuéramos de la misma familia. Yo también te considero como uno de los míos.

A la Dra. Tereza Samico Cavalcanti por ayudarme en mi maestría cuando estaba casi sola y por creer en mi capacidad científica.

A la Dra. Sonsoles Hortelano por ayudarnos y ofrecernos los animales para los experimentos *in vivo*. Al Dr. Mariano García por ayudarnos en la inyección de los animales.

A la Dra. Ana Dopazo, al Dr. Sergio Callejas y de manera especial al Dr. Alberto Benguria por los análisis de microarrays.

A mí querida amiga, compañera y *hermana* Vanesa. Si me pusiera a describir y a agradecer todo lo que me has dado, no terminaría nunca. Todos los que están al nuestro alrededor saben que sin ti no hubiese logrado terminar este trabajo. Creo que muchas veces has hecho más que yo misma por ello y me has dado todo el apoyo personal y laboral en los momentos más difíciles. Aún así, quisiera decirte que tu inteligencia y perspicacia para enfrentar la vida y el trabajo son todo un ejemplo para mí.

A mis compañeros Irene y Ernesto por el cariño, ayuda, pero sobre todo por las risas y buenos momentos que pasamos juntos, incluso cuando todo nos parecía negativo. Espero tenerlos siempre cerca, aunque no pueda ser físicamente. Carlos, gracias por la ayuda científica que me has dado en estos años, principalmente por recibirme de brazos abiertos en el laboratorio de Eduardo. Gracias también por enseñarme casi todas las técnicas que sé hoy día. Quisiera agradecer también a los y las que han estado con nosotros en algún momento, principalmente a Elena, Alex, Laura y Blas.

A los compañeros de la Unidad de Investigación del Hospital La Paz por las ayudas, risas y por el apoyo de siempre. De manera especial a Marta, Carol, Gema, Esther, Loli, Miguel Ángel, Mayte, Albertito, Cristina y Luiz (el brasileño científico más español que conozco).

A João, por aguantarme, apoyarme y por estar siempre cerca. Gracias por tu mirada tan bonita y por enseñarme que uno nunca puede desistir de cambiar el mundo esté donde esté. Gracias a toda la familia Galvão y Souza Cruz, especialmente a Hélio y Ana Maria.

A los y las camaradas de CR y del PRT por el apoyo, amistad y fuerza. Gracias por todo el ejemplo de lucha que me habéis enseñado en mis años españoles. De manera muy especial a Rosi, Caps, Antonito, Ricardo, Miguel, Xulia, Cibeli, Antonio, Tafa, Pau, Narcisa, Manolo, Felipe, Jesús, Enrique, Rocío, Oscar y Sandra.

A mis queridos amigos Luciana, Alessandra B., Carolina R., Alessandra L., Patrícia, Filipe, Rafael, Luciane, Déia, Vero y Camila. Gracias por estar siempre conmigo sea en España o en Brasil. Gracias también a los *capoeiristas* de mi vida: Dirceu, Mauri, Pichón, Lorenzo, Susana, Rodrigo, Inma, Valentina, Cate, Pierre, Juan, Noe, Leire, Carlitos e Inés.

A mi padre y a mi madre. Carminha e Mingo, obrigada por tudo o que vocês me ensinaram nesta vida. Por aguentarem minha maneira de ser, por me apoiarem em minhas idéias malucas e por não se esquecerem de mim nunca. Vocês me deram tudo, até mesmo quando não tinham nada e por isso estou aqui agora, escrevendo estas palavras desleixadas numa tese de doutorado. Amo vocês.

A mis hermanos Adriana, Mateus e Tadzia. Obrigado por cuidar dos nossos paizinhos e cachorrinhos nestes anos e por serem tão unidos uns aos outros e a mim, mesmo estando longe. Dedico este trabalho também à força e personalidade de cada um de vocês.

Este trabajo se ha podido realizar gracias a los fondos proporcionados por la Fundación Mutua Madrileña Automovilística.



Alessandra Soares-Schanoski ha sido financiada por la beca de doctorado pleno de la CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

RESUMEN

Los monocitos / macrófagos (MØ) humanos desarrollan una respuesta citotóxica cuando entran en contacto con tumores. A pesar de ello, cuando estas células se infiltran en el tumor reprograman su respuesta e inician una cooperación con las células tumorales.

El presente trabajo desarrolla un modelo experimental *in vitro* que simula el primer encuentro de MØ con células tumorales (que llamamos T) y la infiltración de estas células en el tumor (TT).

Se realizaron co-cultivos de MØ con las líneas tumorales de origen humano: A431, HeLa, BXPC3 y SKBR3. Mediante ensayos de microarrays observamos que los T y TT presentan perfiles diferenciales que se reflejan en la expresión de diversos genes. Nos centramos principalmente en aquellos responsables de la respuesta inmune por ser el centro de este trabajo. Según los resultados arrojados por los microarrays, los TT presentan una significativa disminución en la expresión de moléculas pro-inflamatorias, tales como IL-12, IL-23 y TNF α , en comparación con los T. En cambio, observamos un aumento en la expresión de genes implicados en procesos tumorales y otros antiinflamatorios (p.e. IL-10 e IRAK-M). Estos datos sugieren un perfil inmunosupresor para los TT.

Por otra parte, comprobamos que el perfil inmunosupresor de los TT también se refleja en la disminución de la activación de la respuesta adaptativa. Estos MØ presentan una represión significativa en la expresión de moléculas del HLA de clase II (HLA-DQ y HLA-DR) lo que repercute en una menor capacidad de inducir la proliferación de linfocitos. Por el contrario, los TT expresan altos niveles de CD64 y esto se traduce en un aumento significativo de su capacidad fagocítica.

El presente trabajo corrobora lo publicado acerca del perfil antiinflamatorio de los MØ humanos infiltrados en tumores (TT) y demuestra, por primera vez, que la disminución en la expresión de moléculas de HLA de clase II, principalmente el haplotipo DR, esta implicada en su menor capacidad presentadora de antígenos. También demostramos que la disminución en la expresión de los genes de HLA-II, es regulado por CIITA en estas células.

En conjunto, los datos aquí presentados indican que nuestro modelo es válido para reproducir el enfrentamiento de MØ a tumores, y el perfil que hemos obtenido de estas células nos da la posibilidad de encontrar mecanismos y dianas importantes para la investigación de la inmunoterapia contra el cáncer.

ABSTRACT

Although blood monocytes / macrophages MØ possess significant cytotoxic activity against tumor cells, tumor infiltrate MØ commonly presents a reprogramming of its response, accompanied by a sort of cooperation with cancer cells.

In this study we developed an *in vitro* model which simulates the first contact between tumor cells and MØ (T) as well as its infiltration in tumors (TT).

We performed cocultures with MØ and four lines tumor cells (A431, HeLa, BXPC3 and SKBR3). We then isolated the MØ from cocultures and submitted both, tumor cells and MØ to microarray analysis. We detected the differential expression of various genes in T and TT, and focused the analysis on those involved in immune response. On one hand, microarrays results showed that TT presented downregulation in pro-inflammatory response molecules such as IL-12, IL-23 and TNF α in comparison to T. On the other hand, we observed an upregulation in cancer process genes and anti-inflammatory molecules such as IL-10 and IRAK-M by TT. Thus, our TT cells present an immunosuppressor profile.

Our results also shown that TT cells present a decreased adaptive response activation. These cells present significant downregulation in HLA class II genes, which promotes an impairment in lymphocytes proliferation. Despite this, TT had a significantly increased CD64 expression that could be translated into its enhanced phagocytic activity.

This work corroborates other publications on anti-inflammatory TT profile and it describes, for the first time, the implication of TT downregulation in HLA-II genes, mainly DR haplotype, in its impaired antigenic presentation. Beside this, we demonstrate that HLA-II downregulation is regulated by CIITA genes in our model.

On the whole, our results validate our model as being efficient in the reproduction of tumor MØ infiltration. Besides this model provides us with a TT profile that presents a series of molecules and mechanisms which could be the targets of immunotherapy research.

ÍNDICE

Listado de Figuras	9
Listado de Tablas.....	11
Abreviaturas	12
1. Introducción	14
1.1 El Cáncer	14
1.1.1. Perspectivas históricas.....	14
1.1.2. Tumorigénesis y Progresión Tumoral	15
1.2. Aspectos Generales del Sistema Inmune Innato.....	19
1.2.1. Los “Toll Like Receptors” y la familia de proteínas de transducción de señal “Interleukin-1 Receptor Associated Kinases”	21
1.2.2. La familia de los “Human Leukocyte Antigens” o “Major Histocompatibility Complex”	24
1.3. Inmunología Tumoral.....	25
1.3.1. Reconocimiento del Tumor por el Sistema Inmune	25
1.3.2. Teoría de la Vigilancia Inmunológica a Tumores	26
1.3.3. La funcionalidad del sistema inmune innato enfrentado a tumores	28
1.3.3. a) Conceptos Darwinianos de Selección Natural y “Edición Inmunológica” de Tumores	28
1.3.3. b) Macrófagos, inflamación y el progreso tumoral	29
2. Materiales y métodos.....	34
2.1. Reactivos	34
2.1.1. Anticuerpos y Análisis de Citometría de Flujo.	35
2.2. Cultivos celulares	35
2.2.1. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica.....	36
2.2.2. Purificación de MØ por adherencia.....	36
2.2.3. Cultivo de líneas celulares.....	36
2.3. Co-cultivos y posterior aislamiento de MØ humanos.	37
2.3.1. Purificación magnética de MØ después de los co-cultivos	37

2.3.2. Comprobación de la pureza de células CD14+ posterior al aislamiento.....	37
2.3.2. a) Proliferación de células CD14+	37
2.3.2. b) Inyección de células CD14+	38
2.4. Aislamiento de ARN y proteínas.....	38
2.4.1. Cuantificación del ARN mensajero.....	38
2.5. Ensayos de Microarrays	40
2.5.1. Amplificación y marcaje de ARN	40
2.5.2. Protocolo de Hibridación, lavado, scan y análisis de imágenes.	41
2.5.3. Análisis estadísticos de los microarrays.	41
2.6. Análisis por Western Blot	42
2.7. Ensayo de Fagocitosis	43
2.8. Ensayo de proliferación de Linfocitos.....	43
2.9. Análisis estadísticos.....	44
3. Resultados	46
3.1. Validación del modelo de TT in vitro	46
3.2. Perfil transcripcional de MØ humanos enfrentados a células tumorales.....	52
3.2.1 Clusters diferenciales entre T y TT obtenidos de los ensayos de Microarray....	56
3.3. Análisis transcripcional de los genes regulados en los microarrays: Validación de la técnica por Q-PCR.....	60
3.4. Validación de expresión proteica de datos obtenidos en los microarrays	72
3.5. Expresión de CD64 y fagocitosis en TT.....	76
3.6. Expresión de HLAs y presentación antigénica de los TT	79
3.7. Papel del HLA-DR en el fenotipo TT estudiado	87
4. Discusión.....	90
5. Conclusiones.....	105
6. Referencias Bibliográficas	107
6.1 Artículos publicados durante el desarrollo del presente trabajo.....	118

LISTADO DE FIGURAS

Figura I1. Esquema de la generación del cáncer.....	16
Figura I2. Resumen esquemático de las fases del proceso metastático.	18
Figura I3. Resumen esquemático de los procesos que interviene la familia de las Interleukin-1 Receptor Associated Kinases.....	23
Figura I4. Función diferencial de los macrófagos enfrentados al cáncer.....	31
Figura R1. Validación del modelo TT in vitro.....	47
Figura R2. Representación esquemática del diseño experimental.	49
Figura R3. Representación esquemática del aislamiento de MØ tras los tratamientos T y TT y comprobación de su pureza.	50
Figura R4. Expresión de citocinas pro-inflamatorias a nivel transcripcional.	51
Figura R5. Modelo del mapa GEDI.	53
Figura R6. Mapas GEDI del transcriptoma obtenidos de los análisis de microarrays.....	54
Figura R7. Pureza del aislamiento de MØ CD14+ in vivo e in vitro.....	55
Figura R8. Representación esquemática de los clusters seleccionados para los análisis del perfil de T y TT.	57
Figura R9. Gráficas circulares de función biológica de cada cluster seleccionado	58
Figura R10. Expresión de TNF α a nivel transcripcional.....	62
Figura R11. Expresión de IL-12p40 a nivel transcripcional	63
Figura R12. Expresión de IL-23p19 a nivel transcripcional	64
Figura R13. Expresión de IL-6 a nivel transcripcional	65
Figura R14. Expresión de LIF a nivel transcripcional	66
Figura R15. Expresión de IL-10 a nivel transcripcional.....	67
Figura R16. Expresión de IRAK-M a nivel transcripcional.....	69
Figura R17. Expresión de TREM-1 a nivel transcripcional por los MØ controles, T y TT.	70
Figura R18. Expresión de NF- κ B2/p100 a nivel transcripcional	71
Figura R19. Validación de los resultados de microarrays a nivel de traduccional.	74
Figura R20. Validación de los resultados de microarrays en nivel de expresión protéica.....	75
Figura R21. Histogramas de la expresión de CD64 en superficie	77
Figura R22. Expresión de CD64 en superficie.....	77
Figura R23. Capacidad Fagocítica de T y TT	79
Figura R24. Expresión de HLA-DQ β 1 a nivel transcripcional.....	81

Figura R25. Expresión de HLA-DR β 1 a nivel transcripcional	82
Figura R26. Expresión de proteica de DM, DQ y DR.	83
Figura R27. Expresión proteica de DQ DR y DM en las líneas tumorales.....	84
Figura R28. Expresión proteica HLA-DM, DQ y DR (extendido a 48 horas).	85
Figura R29. Expresión de CIITA a nivel transcripcional	86
Figura R30. Proliferación de Linfocitos.....	87
Figura R31. Proliferación de Linfocitos tras bloqueo de HLA-DR.	88
Figura D1. Interacción entre TIM (Tumor infiltrated Macrophage) y células tumorales. 91	
Figura D2. Inmunidad tumoral.	103

LISTADO DE TABLAS

Tabla M1. Anticuerpos utilizados en análisis de citometría de flujo y Western Blot.....	35
Tabla M2. Líneas celulares utilizadas.	36
Tabla M3. Secuencia de cebadores utilizados y sus respectivas temperaturas de hibridación, en Q-PCR.	40
Tabla R1. Estructura del modelo de tolerancia a células tumorales.....	48
Tabla R2. Genes considerados más importantes en los Clusters I, II, III y IV.	60
Tabla D1. Comparación de expresión de moléculas por nuestros TT y los TIM de estudios distintos.....	93

ABREVIATURAS

APC: Antigen Processing Cells.
CD: Cluster of Differentiation.
CIITA: Class II Transactivator.
CSF1R: Colony Stimulate Factor 1 Receptor.
CMSP: Células Mononucleares de Sangre Periférica.
DC: Dendritic Cell.
DE: Desviación Estándar.
DD: Death Domain.
DMEM: Dulbecco's MEM.
HLA: Human Leukocyte Antigen.
IL-X: Interleuquina – X.
IRAK: Interleukin-1 Receptor Associated Kinase.
LPS: Lipopolisacárido.
LPA: Lipoprotein A.
LIF: Leukemia Inhibitor Factor.
MØ: Monocitos / macrófagos.
MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase.
MMP: Metaloproteasas.
MyD88: Myeloid Differentiation factor 88.
MHC: Major Histocompatibility Complex.
NK: Natural Killer.
NF-κB: Nuclear Factor - κB.
PBS: Phosphate Buffered Saline.
PGE₂: Prostaglandina E2.
Q-PCR: PCR cuantitativa.
SFB: Suero Fetal Bovino.
TAAs: Tumor Associated Antigens.
TIM: Tumor Infiltrated Macrophages.
TLR: Toll-Like Receptor.
TNFα: Tumor Necrosis Factor α.
TREM-1: Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells.
TGFβ: Transforming Growth Factor.

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1 El Cáncer

1.1.1. Perspectivas históricas

Algunas de las culturas antiguas, atribuían a los dioses la causa del cáncer, creencia mantenida hasta la Edad Media. Los tumores malignos fueron reflejados en pinturas o escrituras de muchas civilizaciones antiguas de Asia, Sudamérica y Egipto. Incluso los osteosarcomas fueron analizados por primera vez en restos de huesos de momias egipcias (1, 2).

Hipócrates (400 a. c.), conocido actualmente como el padre de la medicina, propuso la Teoría Humoral de la Medicina. Esta teoría indica que el cuerpo está compuesto por cuatro fluidos: la sangre, la flema, la bilis amarilla y la bilis negra. Se pensaba que cualquier desequilibrio de estos fluidos causaba enfermedades. Hipócrates atribuyó el exceso de bilis negra al cáncer. También fue el primero en usar las palabras "carcinos" y "carcinoma" para describir los tumores y así nació el uso del término "cáncer" para referirse a esta enfermedad. La palabra "cáncer" se deriva de la palabra griega "karkinos," o cangrejo. Se piensa que se refiere a la apariencia de los vasos sanguíneos al "alimentar" al tumor que se parecen a las pinzas de un cangrejo (2). A pesar de ser incorrecta, la teoría de Hipócrates fue la primera que atribuyó causas naturales al cáncer.

Posteriormente, en la Edad Media empezaron a surgir designaciones del cáncer como una enfermedad heredada o causada por agentes ambientales, los carcinógenos. En 1775 el físico inglés Percival Pott hizo un interesante estudio epidemiológico: Detectó un agente carcinógeno al que estaban expuestos los limpiadores de chimeneas de fábricas, quienes padecían de cáncer de próstata (3, 4). En este estudio Sir Pott no sólo determinó la existencia del carcinógeno, sino también que se podría desarrollar la enfermedad años después de la exposición al mismo. Las deducciones de Pott llevaron al comienzo del conocimiento de las propiedades biológicas de los tumores, enfermedad que actualmente constituye una de las tres principales causas de muerte en los países industrializados (4, 5).

1.1.2. Tumorigénesis y Progresión Tumoral

El cáncer es un proceso múltiple y coordinado en el que una célula (o un pequeño grupo de ellas) sufre mutaciones genéticas y epigenéticas llevando, por una parte, a la activación de proto-oncogenes y por otra, a la inactivación de genes supresores tumorales normalmente activos en nuestro organismo (6). Estas células adquieren un fenotipo maligno que reprime el control del ciclo celular, inhibiendo la apoptosis y/o la senescencia, provocando una proliferación anormal que se puede transformar en masas de tejidos (7-9).

Es bien sabido que las células transformadas pierden su respuesta a algunas de las señales extrínsecas, enviadas por las células circundantes que se encuentran en la matriz extracelular del tumor y que, habitualmente, operan para mantener la homeostasis del hospedador (8). De esta forma, los tumores no están sujetos a las restricciones normales concernientes a la proliferación celular. Por otra parte, estas células pierden la capacidad de diferenciación y por ende su función inicial (4). La pérdida de la capacidad de diferenciación les permite generar un fenotipo agresivo y con habilidad de invasión (4, 9). La figura I1 esquematiza, a grandes rasgos, el proceso de generación del cáncer.

Si nos centramos en la destrucción tisular, etapa importante para la invasión del tumor, ocurre como resultado de la transformación celular, es decir, de las mutaciones que sufren las células pro-tumorales. De esta manera, se inicia la producción de factores que les permite a las células tumorales escindirse del tumor primario (p.e. Metaloproteasas, MMPs, refs: (7, 10, 11)). El cáncer progresa cuando las células somáticas adquieren señales promitóticas y evaden los mecanismos supresores en el microambiente tumoral (8). Cabe destacar que en esta fase de destrucción tisular se inducen respuestas para la reparación del tejido y reacciones inflamatorias que pueden tener una función importante en la progresión tumoral (8, 11), lo cual trataremos con mayor detalle más adelante.

Es conocido que el tumor maligno no puede crecer más allá de un determinado tamaño, por las condiciones que se genera en su propio microambiente como son la falta de oxígeno y nutrientes (4). De esta manera, necesita escindirse del tumor primario, buscando las condiciones óptimas para su progreso. Por lo tanto, la formación de la neo vasculatura tumoral o angiogénesis y con ello el acceso a la vasculatura del hospedador, son uno de los pasos más importantes para que ocurra tanto la progresión

tumoral local como la metástasis (12-14). El patrón de diseminación metastásica generalmente empieza por la colonización de los linfonodos locales, pero puede llevar a la invasión de órganos distantes (14). En este sentido, la diseminación metastásica depende de la respuesta fisiológica del órgano en cuestión o del tipo de cáncer, y se ve reflejada por la heterogeneidad de las células tumorales.

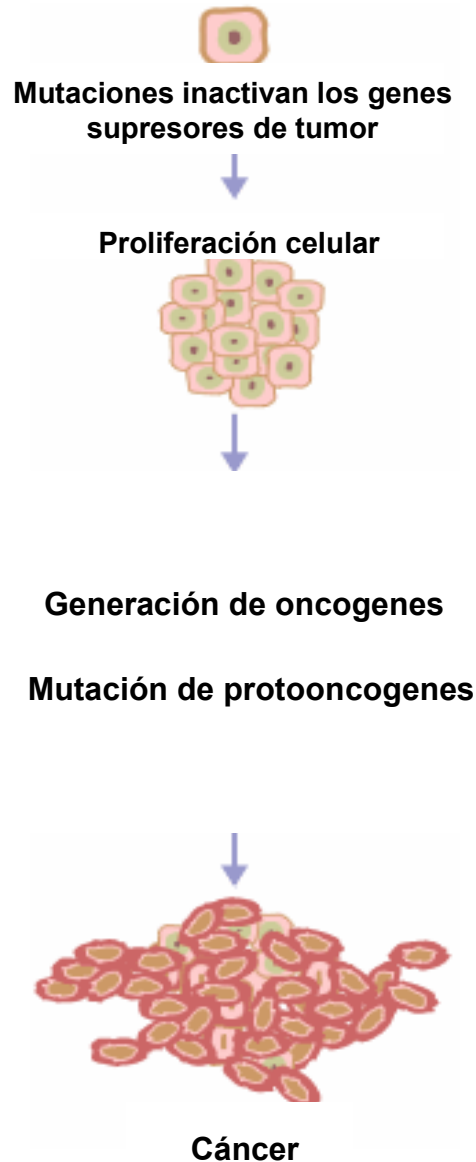


Figura II. Esquema de la generación del cáncer.

La metástasis puede ser considerada un proceso ineficiente, ya que pocas células son capaces de escindirse del tumor primario y colonizar órganos vitales, en ocasiones distantes (10). No obstante, las células tumorales, por su heterogeneidad e inestabilidad genética, pueden ser capaces de generar células con un fenotipo que les posibilita colonizar microambientes considerados incompatibles.

Cuando las células tumorales abandonan su nicho muchas se mueren bien por el estrés causado por la salida de su microambiente inicial, o debido a las condiciones desfavorables con las que se encuentran hasta llegar a los órganos distantes (14). Por lo tanto, para que el proceso metastático sea exitoso, la célula tumoral tiene que pasar por algunas etapas importantes como son: escisión del tumor primario, entrada al torrente sanguíneo (sistema linfático) y supervivencia en el mismo y finalmente invasión y colonización de nuevos tejidos. La figura I2 ilustra el proceso metastático (10, 14). La división del proceso metastático en fases, nos facilita el estudio contextual y práctico de este fenómeno.

Como comentábamos anteriormente, la ventura del tumor depende de que se genere un microambiente favorable. En este sentido, las células pertenecientes al estroma tumoral, compuesto de tejido conectivo, vasos sanguíneos y de células inflamatorias infiltradas (15, 16); desempeñan una función crucial, en la comunicación bidireccional entre células tumorales, tisulares y las células del hospedador.

En lo que se refiere a la interacción de las células tumorales con las células sanas del hospedador; las moléculas de adhesión desempeñan un papel importante en el control de la señalización que traspasa del exterior al interior del tumor (10, 17). Apenas mencionaremos algunas de las diferentes clases de moléculas de adhesión, ya que representan un grupo de moléculas muy heterogéneo y no son el objeto de este estudio. Entre ellas están las integrinas, las caderinas, las selectinas, miembros de la familia de las inmunoglobulinas y el ácido hialurónico (HA) (10). Este último es un polímero que ha cobrado importancia debido a su posible papel como regulador de la inflamación en diferentes contextos. Dependiendo de su longitud puede tener funciones distintas (18) por ejemplo, los polímeros de alto peso molecular (hasta 2×10^4 KDa) presentan funciones inmunosupresoras, mientras que los menores (hasta 2×10^4 KDa) son inflamatorios e inmunoestimuladores (18). Además se ha observado que el HA puede ser liberado por las células tumorales e induce la tolerancia a tumores de los monocitos circulantes al unirse a los receptores CD44 o TLR4 (19). Estas observaciones fueron realizadas en nuestro laboratorio con anterioridad al presente trabajo.

Hasta ahora hemos comentado básicamente las propiedades de las células tumorales. Sin embargo, actualmente las interacciones entre la célula tumoral y la célula sana del hospedador están siendo el foco de muchos estudios (11, 20, 21). Desde que se ha detectado que las células del sistema inmune se infiltran en el tumor sólido (17, 22,

23) se esta cambiando el sistema de referencia de investigación; antes centrado en la célula tumoral mientras que ahora se está fijando en la célula inmune infiltrada.

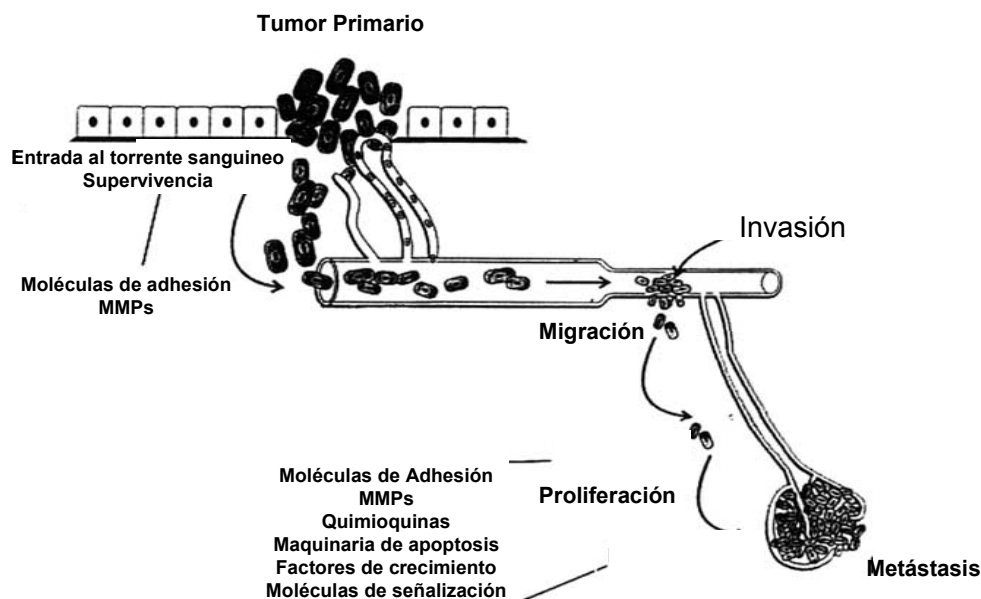


Figura I2. Resumen esquemático de las fases del proceso metastático.

Las células del tumor primario entran en el torrente sanguíneo a través de los vasos originados por el proceso de angiogénesis. Para que este proceso ocurra, las células tumorales utilizan las MMPs para la disrupción tisular y extravasación del tumor primario. De esta manera, las células tumorales migran por el torrente sanguíneo y las que logran sobrevivir inician su proliferación. Tanto para su supervivencia como para su proliferación utilizan moléculas de adhesión, factores de crecimiento y manipulan a la maquinaria de apoptosis; a su vez, envían señales a las células circundantes a través de quimioquinas y otras moléculas de señalización. Finalmente colonizan el órgano distante iniciando el proceso metastático. Modificada de Cairns, et al (10).

El descubrimiento de que las células del sistema inmune se infiltran en el tumor ha hecho que muchos estudios se enfocaran en el sistema inmune enfrentado a tumores (7, 13, 24). Por ello, existen aspectos importantes relacionados con la inmunología y el proceso tumoral y como es bien sabido, las células del sistema inmune son capaces de discernir entre el “propio” y el “no propio”, es decir, son capaces de reconocer a los antígenos (4).

Las transformaciones genéticas que sufren las células tumorales provocan la expresión de determinados antígenos tumorales que pueden ser reconocidos por el sistema inmune del hospedador (25, 26). Esta teoría conocida como vigilancia inmunológica a tumores, puede o no ser un proceso exitoso (8, 25-27). Por lo que es de gran importancia para el presente trabajo que nos centremos en la respuesta inmunológica a tumores, principalmente la respuesta innata.

1.2. Aspectos Generales del Sistema Inmune Innato

Ocasionalmente los microorganismos que son encontrados diariamente en la vida del individuo sano son capaces de desencadenar enfermedades perceptibles (4, 28). Estos agentes infecciosos son reconocidos y atacados en los primeros momentos por mecanismos de defensa que no requieren un período prolongado de exposición. Esto es posible porque no dependen de la expansión clonal de linfocitos específicos en respuesta a determinados antígenos (28). De manera general, estos son los mecanismos básicos conocidos como pertenecientes a la respuesta inmune innata y que hasta hace poco tiempo era conocida como la respuesta inmune inespecífica (29). Es conocido que, además de los microorganismos, el sistema inmune innato se puede activar como respuesta a otros agentes que resulten agresiones externas como puede ser quemaduras, golpes que provoquen contorciones o fracturas del sistema óseo, heridas (30), y también transformaciones internas como son los tumores (25). Actualmente, entendemos la respuesta innata como la primera línea de defensa del organismo que puede activar la respuesta adaptativa cuando no ha sido eliminada la “agresión” recibida (30). Podemos así diferenciar la doble funcionalidad de la respuesta innata, que primero intenta eliminar la agresión, pero también regula la activación de la respuesta adaptativa (28).

Las principales células del sistema inmune innato son las de origen mieloide, dentro de las cuales están las que tienen capacidad fagocítica y presentadora de antígenos APCs (del inglés Antigen Processing Cells), como los monocitos/macrófagos y las células dendríticas. Otras células importantes son las NK (del inglés Natural Killer) y los neutrófilos (28). Por lo general estas células secretan proteínas pro-inflamatorias llamadas citocinas en respuesta a una agresión extrema (28) o el reconocimiento de antígenos tumorales (31, 32). Las citocinas son a su vez capaces de unirse a receptores específicos de otras células del mismo sistema, desencadenando la activación/regulación de distintas células efectoras del sistema inmune. Las citocinas

más conocidas, y que son secretadas por macrófagos son IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-23 (del inglés Interleukin) y el TNF α (del inglés Tumor Necrosis Factor) (28). A parte de las citocinas, las células del sistema inmune innato pueden secretar quimioquinas, quienes tienen propiedades quimioatrayentes induciendo la migración al sitio de producción de la quimioquina (28).

Entre las células del sistema inmune innato los monocitos/macrófagos son una de las más importantes por sus características e implicación en diversos procesos de la respuesta a agresiones. Los monocitos son células circulantes que se diferencian a macrófagos continuamente e inmediatamente después de su migración a tejidos y/o cuando se encuentran con un estímulo (28, 33, 34). La heterogeneidad de los monocitos/macrófagos (M \emptyset) es bien conocida y depende del estímulo local que reciban. De esta forma, cada subpoblación de M \emptyset presenta funciones fisiológicas distintas que son el reflejo de su reclutamiento a sitios de inflamación o su entrada a tejidos (33). Además, los M \emptyset se pueden diferenciar a células especializadas como son, por ejemplo, las células dendríticas o los osteoclastos. Los marcadores de superficie más comunes de los M \emptyset son CD14, CD163, CD63, CD68, CD74, CD86, CD164, CD44 (del inglés Cluster of Differentiation), CSF1R (del inglés Colony Stimulator Factor 1 Receptor) y los TLRs (del inglés Toll Like Receptors) (33, 34).

Los M \emptyset son, con las dendríticas, las principales células presentadoras de antígeno, aunque los linfocitos B también pueden desempeñar este papel en algún caso (28). Esta función de los M \emptyset sólo es posible por su capacidad fagocítica, mediante la cual controlan el exceso de células senescentes en degradación o apoptóticas (20). Los M \emptyset también fagocitan a los microorganismos (20, 33). Es importante destacar que los M \emptyset representan una de las más importante uniones entre el sistema inmune innato y el adaptativo dado que, una vez que fagocitan, pueden presentar antígenos y “despertar” la respuesta adaptativa.

Uno de los receptores más importantes de los M \emptyset son los TLRs (también expresados por las células dendríticas y otras células de mucosa y endotelio), porque les posibilita activar distintas cascadas de señalización cruciales para el funcionamiento del sistema inmune innato (35) y a la vez le proporciona mayor especificidad de lo que anteriormente se pensaba.

1.2.1. Los “*Toll Like Receptors*” y la familia de proteínas de transducción de señal “*Interleukin-1 Receptor Associated Kinases*”

Hace aproximadamente una década, se empezó a asumir que la respuesta inmune innata no es “inespecífica” como se afirmaba. El cambio del término inespecífico por innato fue catalizado entre otras cosas por el descubrimiento los receptores TLRs (36). Estos receptores, inicialmente descritos en *Drosophila Melanogaster*, demostraron que la respuesta inmune innata se activa a través del reconocimiento específico de antígenos por estos receptores (36). Se ha demostrado que los MØ y las células dendríticas expresan estos receptores (34), que se unen a ligandos específicos, ya sea individualmente, o dimerizándose entre ellos u otras proteínas de membrana (37). Su activación puede llevar a la producción de citocinas inflamatorias a través de la activación de la vía que implica la traslocación al núcleo del factor de transcripción NF-κB (del inglés Nuclear Factor κappa B) o incluso, pueden llevar a la producción de moléculas coestimuladoras que activan a la respuesta inmune adaptativa (35, 38).

En mamíferos, los TLR constituyen una familia de al menos 13 receptores, la mayoría de ellos son expresados en membrana aunque esto depende del ligando que reconozcan (39, 40). Por ejemplo, el TLR3 se encuentra en endosomas por su capacidad de reconocer a ARNs de doble hélice (típicos de virus) y el TLR4 se localiza en la superficie celular, por reconocer al lipopolisacárido de bacterias Gram negativas. Recientemente, se ha demostrado que algunos TLRs pueden reconocer antígenos tumorales, al menos de aquellos cánceres inducidos por virus (35). En el caso particular del TLR4, es capaz de reconocer ligandos del organismo del hospedador: proteínas de choque térmico (41), fibrinógeno (41) o el ácido hialurónico liberado por células tumorales (19).

Es interesante destacar que muchos tipos de células tumorales humanas y de ratón expresan algunos TLR (principalmente TLR4) para evadir al sistema inmune (35). Un estudio demostró que el silenciamiento génico del TLR4 en células tumorales de ratón que lo sobre expresan, producen un retardo en el crecimiento tumoral en comparación con los ratones inyectados con las células tumorales no mutadas. En este mismo estudio se observó que hay una disminución en el control de la activación de los linfocitos T cuando las células tumorales expresan TLR4 (42). De momento hay pocos trabajos que definen la expresión y función de los TLRs en células que no sean los MØ o las dendríticas.

En la cascada de señalización que se activa una vez que los TLRs reconocen su ligando está una familia importante de proteínas, las IRAKs (del inglés Interleukin Receptor Associated Kinase (19, 43-49).

El primer miembro descrito de esta familia, IRAK-1, fue descubierto por su propiedad de inmunoprecipitación con el receptor de IL-1 y también por su papel en la inmunidad de *Drosophila Melanogaster*. A esta familia también pertenecen: IRAK-2, IRAK-3 (conocida también como IRAK-M) e IRAK-4 (50). Las cuatro IRAKs presentan un dominio DD (del inglés Death Domain), mediante el cual interaccionan con sus proteínas adaptadoras, como por ejemplo el MyD88 (del inglés Myeloid Differentiation 88) y un dominio quinasa que les diferencia entre sí. Las IRAK-1 e IRAK-4 presentan el dominio quinasa funcional, mientras que en la IRAK-M este dominio tiene un cambio en un residuo aminoacídico que hace que sea considerada una “pseudoquinasa” (51). Se pensaba que IRAK-2 también era una “pseudoquinasa” como IRAK-M, pero un estudio reciente demostró que es enzimáticamente activa (52, 53).

El papel de IRAK-M en la cascada de señalización fue demostrado al estudiar el fenotipo del ratón “knock-out” para esta pseudoquinasa. Estos ratones presentaban una sobre actividad de la cascada de señalización iniciada por IL-1 y varios TLR que culminaba en una respuesta inflamatoria excesiva (54). Los datos indicaban que IRAK-M desempeña una función de regulación negativa de la activación de NF- κ B y de la respuesta inflamatoria resultante de esta cascada de señalización (54). Otros estudios demostraron que IRAK-M está implicada en distintos procesos, como el control de la osteoclastogénesis (48, 55) y la tolerancia de MØ a endotoxinas (43, 49) en pacientes con síndrome coronario (44). También se ha descrito a IRAK-M como un elemento esencial en la tolerancia al cáncer que presentan los MØ infiltrados en tumores (19). En cuanto a su regulación, en nuestro grupo se demostró que TNF α juega un papel importante en este proceso (46).

La figura I3 esquematiza la cascada de señalización de las IRAKs tras la unión de TLR con su ligando.

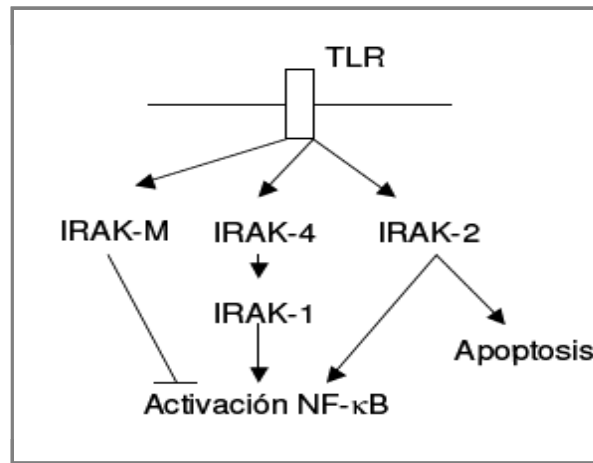


Figura I3. Resumen esquemático de los procesos que interviene la familia de las Interleukin-1 Receptor Associated Kinases.

IRAK-1 e IRAK-2 intervienen en la activación de NF-κB. IRAK-2 también tiene un papel importante en la inducción de la apoptosis. IRAK-4 fosforila a IRAK-1, actuando de esta manera en la activación de la cascada de señalización. IRAK-M presenta una función supresora de la actividad de NF-κB, actuando a nivel de la IRAK-1 y/o IRAK-4. (Modificada de Huang, et al, 2005) (56).

Debido a su importancia en la elección del modelo experimental utilizado en este trabajo, más adelante discutiremos algunos datos publicados respecto a IRAK-M y la respuesta inmune a tumores.

Cabe destacar que estamos dando énfasis solamente a algunas de las moléculas, células y cascadas de señalización implicadas en la respuesta inmune innata. Asimismo queremos darle más énfasis a una de las funciones cruciales de la respuesta innata; la presentación antigénica. En este sentido, los mediadores inflamatorios y las células presentadoras de antígenos, como los MØ, intervienen en la presentación antigénica, regulando la expresión de los antígenos leucocitarios humanos (traducción del inglés Human Leukocyte Antigens, HLA), (57). Tanto la presentación antigénica como la producción de ciertas citocinas, inducen una proliferación selectiva de linfocitos T y B. Por todo ello, en el reconocimiento de antígenos tumorales, la familia de los HLA juega un papel crucial, en lo cual profundizaremos seguidamente.

1.2.2. La familia de los “*Human Leukocyte Antigens*” o “Major Histocompatibility Complex”

Como hemos mencionado anteriormente, una de las vías de activación de la respuesta inmune adaptativa, es la presentación antigénica a través de las APCs. Estos antígenos pueden provenir de la existencia de células infectadas por patógenos o bien de péptidos resultantes de la fagocitosis y del posterior procesamiento antigénico. Los péptidos son “captados” por glicoproteínas especializadas expresadas por las células hospedadoras, nombradas HLA o MHC (del inglés Human Leukocyte Antigens para humanos o Major Histocompatibility Complex para ratones). Las moléculas de HLA son codificadas por un inmenso grupo de genes y se observaron por vez primera debido a su implicación en el rechazo a trasplantes de tejidos (4, 28).

Los HLA pueden ser agrupados en tres clases: Los de clase I, son expresados por todas las células. Los de clase II son expresados solamente por aquellas células involucradas en el sistema inmune, entre las que destacan las APCs. Finalmente, los de clase III codifican citocinas como el TNF α y moléculas del sistema del complemento (28).

En humanos el HLA I presenta tres diferentes haplotipos, el A, B y C. Por su parte el HLA de clase II presenta otros haplotipos: el DP, DQ y DR expresados en la superficie celular, y otros dos intracelulares el DM y el DO (28). La expresión de las moléculas de clase II del HLA se controlan, entre otros factores, por la acción del CIITA (del inglés Class II Transactivator), un coactivador de los genes de HLA clase II que interactúa con el factor de transcripción RFX5 (del inglés Regulatory Factor X 5) (28, 58, 59). Es conocido que los HLA I y II tienen una función crucial en el proceso de presentación antigénica. En este proceso, las proteínas son degradadas a péptidos en el interior de las células presentadoras de antígenos y luego son transportados por los HLA a la superficie celular. Los HLA de clase I procesan y presentan al antígeno de manera distinta a los de clase II.

En el procesamiento y presentación a través del HLA I, los péptidos que se encuentran en el citosol celular son degradados en el proteasoma celular. Tras ello, se unen al complejo de proteínas calnexina, calreticulina, TAP 1 y 2 (del inglés Associated Protein Tapasin), Erp57 (protein disulfide-isomerase 57), y el HLA I. Luego, el HLA I, y el péptido son transportados a la superficie de la célula para ser presentados a los linfocitos T CD4⁺ (28). En el caso del HLA II, los antígenos ajenos extracelulares, son

fagocitados y llevados al endosoma celular que sufre una disminución en el pH. Los antígenos son degradados por proteasas y los péptidos resultantes se unen al HLA II recién sintetizado. Este complejo es transportado a la superficie celular para su ulterior presentación a los linfocitos T CD8+ (28).

La presentación antigénica es un proceso crucial para entender la relación del sistema inmune innato y el cáncer. Hasta el momento hemos introducido los conceptos de este proceso, y a continuación lo llevaremos al ámbito del tumor.

1.3. Inmunología Tumoral

Hasta ahora hemos comentado muy brevemente la respuesta inmune innata. A parte de lo mencionado, existen otra gran cantidad de moléculas y maquinarias de señalización que intervienen en esta respuesta (28). De todos modos, hasta hace algunas décadas casi todo lo que se había demostrado de la inmunidad innata se refería a la respuesta del hospedador a los microorganismos, afortunadamente hoy día se ha empezado a dar particular énfasis a la respuesta inmune a tumores.

Una de las primeras pruebas de que el sistema inmune puede reconocer a las células tumorales se obtuvo en un estudio que demostró que tumores trasplantados sufrían retroceso en su crecimiento en ratones sanos, mientras que progresaban en ratones inmunosuprimidos (60). Este estudio y otros más elaborados, han posibilitado que se vislumbrara la manipulación de la respuesta inmune contra tumores con técnicas de inmunoterapia (17, 61). Sin embargo, todavía nos falta investigar muchos matices del sistema inmune frente a tumores, ya que puede desempeñar papeles totalmente contradictorios en la defensa del hospedador que contrae el cáncer (27).

1.3.1. Reconocimiento del Tumor por el Sistema Inmune

Es conocido que las células tumorales expresan proteínas, productos de protooncogenes mutados, que pueden ser antigénicos. Estos son los llamados TAAs (del inglés Tumor Associated Antigens) (4, 8, 28). Este es el caso de *Ras* y *p53*, ambas proteínas reguladoras del ciclo celular (28). Los péptidos de estas y otras proteínas mutadas pueden asociarse a las moléculas de MHC o HLA clase I o II, expresada en la superficie de la célula tumoral, para su posterior reconocimiento por las células presentadoras de antígenos o incluso directamente por los linfocitos T o B (27, 32).

A pesar de que los tumores expresan antígenos tumorales, y aún habiendo evidencias de control inmunológico contra el cáncer, se conjetura que en diversos casos este control no es total, ya que sigue siendo una enfermedad mortal. Por ello la importancia de estudiar los mecanismos involucrados en la respuesta inmune a tumores, ya que existen evidencias de que no todas las células del sistema inmune tienen capacidad de suprimir a los tumores. Por lo contrario, en algunos casos auxilian a la progresión tumoral (11, 22, 62). Un ejemplo aparentemente claro de esto último lo constituyen los MØ, estas células pueden “ayudar” a la angiogénesis y la metástasis (14, 22).

Muchos autores afirman que en el microambiente tumoral existe un equilibrio entre los procesos de evasión del tumor al sistema inmune y colaboración mutua entre células tumorales y macrófagos (9, 11, 13, 22, 32, 63). Por ello, se afirma que el fenotipo y el desarrollo del tumor son un reflejo de las interacciones en el pasado entre la célula tumoral y el sistema inmune (27).

1.3.2. Teoría de la Vigilancia Inmunológica a Tumores

El papel del sistema inmune en la prevención y potencial erradicación de tumores fue concebido por Paul Ehlich en 1909 (64), quién sugirió que el cáncer sería más frecuente si el sistema inmune no controlara la aparición continua de células transformadas. Medio siglo más tarde, Burnet en 1957 reactivó esta hipótesis, sugiriendo que el linfocito T funciona como el efector mayor de este sistema. Burnet acuñó el término “vigilancia inmunológica o inmunovigilancia” definido como la habilidad del sistema inmune de detectar y destruir a las células tumorales (65). Este proceso está mediado por el reconocimiento de los antígenos que expresan las células transformadas (8, 25-27). Experimentalmente, resulta difícil observar la vigilancia inmunológica a tumores en humanos. No obstante, últimamente se han publicado muchos estudios en este campo. Estos estudios abrieron las puertas a tres importantes áreas de investigación: las poblaciones celulares (incluyendo las del sistema inmune) infiltradas en tumores, la generación de la inmunidad endógena contra antígenos tumorales y la relación entre inmunodeficiencia y cáncer. Esta última como consecuencia de la observación de que los pacientes inmunodeficientes presentan mayores riesgos de desarrollar cáncer (27).

En este sentido, existen algunos estudios en animales o “*in vitro*” que pueden definir aspectos directos o indirectos de la vigilancia inmunológica a tumores. Algunos autores que estudiaron tumores espontáneos o utilizaron modelos de tumores inducidos químicamente en ratones, demostraron que el sistema inmune puede “sobrevivir” al ataque de las células aberrantes y tiene una función importante en la prevención de la formación del tumor (60, 66, 67). Por ejemplo Shankaran, *et al*, 2001 demostraron que ratones “knock-out” para el receptor de IFN- γ (del inglés Interferon) desarrollaron sarcomas más rápidamente que los animales no transformados (66). En la misma línea, ratones “knock-out” para RAG2^{-/-} (del inglés Recombination Activated Gene), o sea que carecen de la capacidad de madurar linfocitos T o B, son más susceptibles al desarrollo de tumores inducidos químicamente (67).

Por otro lado, los tumores desarrollan mecanismos de evasión del sistema inmune que pueden ser consecuencia de alteraciones que se manifiestan en la fase de vigilancia inmunológica (32). Se ha observado que las células tumorales pueden presentar deficiencias en la vía de procesamiento y presentación de antígenos, pudiendo así, “escondarse” de la respuesta adaptativa (66). O bien pueden suprimir la inducción de señales inflamatorias de “peligro”, provocando un fallo en la maduración de células dendríticas (68). El significado biológico de estos mecanismos, es que puede no darse la presentación antigénica de los tumores por las APCs, lo que imposibilitaría la activación de la respuesta adaptativa (32).

Es común observar la infiltración de células inmunes efectoras a tumores tanto en pacientes (9), como en modelos animales (31). Los MØ, considerados la primera línea de defensa en tumores son la población celular mayoritaria infiltrada en muchos tumores (9, 22). Estas células se infiltran en el tumor en estadios muy tempranos del desarrollo tumoral y pueden indicar un mal pronóstico para el hospedador (23). Esto ha sido observado en los tumores de cervix, próstata, mama y vejiga (62). Además, se sabe de la infiltración de otros tipos de leucocitos (23) como las células T reguladoras (69). Los macrófagos, siendo la población mayoritaria infiltrada, pueden representar casi un 50% de un tumor sólido en casos extremos como en algunos tumores de mama (9). Por lo que se justifica un estudio detallado de los mecanismos moleculares que se activan/desactivan durante la infiltración de MØ en los tumores. Uno de los problemas que tenemos en estudiar esta fase es la falta de modelos experimentales tanto *in vitro* como *in vivo*.

Profundizaremos y discutiremos otros datos publicados de las funciones de los MØ en el contexto tumoral más adelante, ya que se trata del eje de nuestro trabajo.

1.3.3. La funcionalidad del sistema inmune innato enfrentado a tumores

1.3.3. a) Conceptos Darwinianos de Selección Natural y “Edición Inmunológica” de Tumores

Hemos mencionado que el sistema inmunológico presenta dos efectos paradójicos sobre el cáncer. Existen evidencias que apuntan que en el proceso de vigilancia inmunológica las células efectoras de la respuesta inmune pueden prevenir principalmente el desarrollo de tumores nacientes (8). A pesar de existir datos que afirman que este proceso puede tener mecanismos intrínsecos supresores de la progresión tumoral (8, 27).

Por otro lado, la inmunidad puede perfilar la naturaleza intrínseca de los tumores, a través de la presión ejercida por la vigilancia inmunológica (6, 14, 70). De hecho algunos autores afirman que no hay evasión sin presión inmunológica (26). Estos mismos autores afirman que esta presión del sistema inmune genera variantes tumorales más resistentes en el ámbito de la inestabilidad génica. La importancia de estas conclusiones es que la “selección natural” de células tumorales heterogéneas resulta en la supervivencia y proliferación de variantes que poseen características genéticas y estados epigenéticos que facilitan su crecimiento y una evasión más eficiente del sistema inmune.

El proceso de edición inmunológica de tumores consiste de tres fases (8):

1º La eliminación, que como hemos visto hasta ahora es el proceso de vigilancia inmunológica.

2ª El equilibrio, que consiste en la incompleta destrucción de las células tumorales y “armonía” entre las células inmunes infiltradas y las células tumorales remanentes/resistentes.

3ª La evasión, en la que las células tumorales “esquivan” completamente el sistema inmune y pueden progresar e invadir nuevos tejidos.

Actualmente, la publicación de varios estudios de inmunología tumoral está favoreciendo la comprensión de estas fases de la “edición inmunológica” tumoral (32, 66, 67, 71). En este sentido, es necesario enfatizar en la interacción del macrófago con

la célula tumoral, por ser uno de los primeros contactos entre células del sistema inmune y las células aberrantes.

1.3.3. b) Macrófagos, inflamación y el progreso tumoral

En un pasado reciente, la relación entre inflamación y progresión tumoral era considerada casual. Sin embargo, esta opinión cambió cuando se observó, a través de estudios epidemiológicos, que la relación podría ser más directa de lo que se suponía (72). En uno de estos estudios, se demostró que el 95% de las mujeres que habían presentado previamente inflamación pélvica o endometriosis posteriormente desarrollaban cáncer de ovario (73). Otros autores observaron que la inflamación crónica está asociada con la progresión de diversos tipos de cánceres como por ejemplo, pulmonar, gástrico, pancreático, de próstata entre otros (72). Un hecho a tomar en cuenta es la creencia entre los cirujanos que: "... cuando existe inflamación (entendida por infiltración de células del sistema inmune) existe metástasis". Así, durante las últimas décadas la controversia de si el sistema inmune controla negativamente o positivamente la progresión tumoral, ha sido centro de grandes debates.

Según la teoría de la vigilancia inmunológica, que hemos presentado anteriormente, el sistema inmune reconoce y puede erradicar el tumor (8, 27). Los MØ son reclutados rápidamente al sitio del tumor, secretan citocinas que atraen a las células dendríticas y a las NKs, o bien fagocitan a las células tumorales para posterior presentación a los linfocitos T y B y la activación de la respuesta adaptativa. La activación de las células NK y dendríticas inicia la respuesta inmune contra el tumor (32).

Por otro lado, en muchos de los casos las células tumorales más resistentes persisten, por el proceso de inmunoselección (25, 26). Posteriormente a este proceso, las células del sistema inmune, principalmente los macrófagos, se convierten en cooperadoras de la progresión tumoral (22). Tanto es así que últimamente se han publicado diversos estudios sobre los mecanismos moleculares que activan a los MØ infiltrados en tumores, los TIM (del inglés, Tumors Infiltrated Macrophages) (22). En absoluto contraste con los monocitos circulantes, que generan una respuesta citotóxica tanto contra microorganismos (49) como contra células malignas (63); los TIM presentan una reprogramación de la actividad inmunológica que les hace perder la eficiencia contra los tumores.

Es importante destacar que los MØ que tienen una respuesta citotóxica contra patógenos o tumores son llamados M1 (activación clásica), mientras que aquellos que presentan la respuesta inflamatoria y capacidad de activar al sistema adaptativo disminuida, son llamados M2 (activación alternativa) (22, 31, 74). El principal estímulo que genera los M1 es el IFN γ (69), mientras que en el caso de los M2 pueden ser IL-4 o IL-13 (69).

Existen evidencias de que los TIM presentan características similares a los M2, básicamente: alta expresión de IL-10 (citocina antiinflamatoria) y baja expresión de IL-12 e IL-23 (citocinas pro-inflamatorias) (22, 31, 74). Las características de los M2, así como de los TIM todavía están siendo investigadas, ya que pueden presentar perfiles variables dependiendo de la situación, patógeno/tipo de cáncer y microambiente en cuestión (69). Por su parte, los M1 se caracterizan por ser activados por diversos estímulos inflamatorios como: IFN- γ , como se ha comentado anteriormente, productos microbianos (LPS, LPA etc.), o antígenos tumorales. Estas células producen especies reactivas de oxígeno, citocinas inflamatorias como IL-1, IL-6, IL-12 y TNF α , receptores “scavenger” (del inglés secuestrador), receptores de manosa y grandes cantidades de HLAs (31, 69).

En lo que se refiere a las características de estos MØ, existen estudios que afirman que los TIM sobre expresan TNF α , comparado con los M1 (74) y otros que observaron que bajan significativamente la expresión de esta molécula (19, 63). Algo similar ocurre con respecto a IL-6 e IL-12 que su expresión por los TIM depende del tipo del tumor o del modelo experimental utilizado (69, 74). Así que se puede decir que los TIM y los M2 (quienes sí presentan una bajada en la producción de TNF α), exhiben expresión variable para estas moléculas. En cambio, podemos afirmar que tanto los TIM como los M2 siempre sobre expresan IL-10 con respecto a los M1 o a los monocitos no activados (69, 74).

Por otra parte, queda patente con estos estudios, que los MØ, que inicialmente son efectivos contra tumores, cuando entran en contacto con el microambiente tumoral empiezan a cambiar su perfil y volviéndose incapaces de generar una respuesta anti-tumoral (13, 19, 63).

Veamos como se define la composición celular del microambiente tumoral y su interacción con los TIM. Los tumores sólidos contienen una combinación dinámica de células del sistema inmune entre las que se encuentran: MØ, células dendríticas, linfocitos, células endoteliales, fibroblastos, células perivasculares y las propias células

malignas. Los MØ circulantes y los residentes en el tejido donde se desarrollará el tumor son reclutados a través de quimioquinas y factores de crecimiento secretadas por el tumor como TGFβ (del inglés Transforming Growth Factor) y MCSF-1 (del inglés Macrophage Colony Stimulator Factor) (21, 27). Además los tumores secretan IL-4 e IL-10 que estimulan a la reprogramación de M1 a M2 (22).

Cuando los MØ se infiltran en el tumor (TIM) y desarrollan algunas de las características de los M2, inician la cooperación con la progresión tumoral secretando factores tales como citocinas y VEGF (del inglés Vascular and Endothelial Growth Factor) que suprimen la respuesta tumoral y MMPs que inducen la proliferación e invasión propiciando la angiogénesis y la metastasis neoplásica (7, 22, 32). La figura I4 ilustra esquemáticamente las diferencias entre los M1 y los M2 durante el proceso tumoral. Vale destacar que el proceso de conversión de M1 a M2 no es estático y lineal y aún no se puede afirmar con absoluta seguridad si un M2 puede volver a ser un M1.

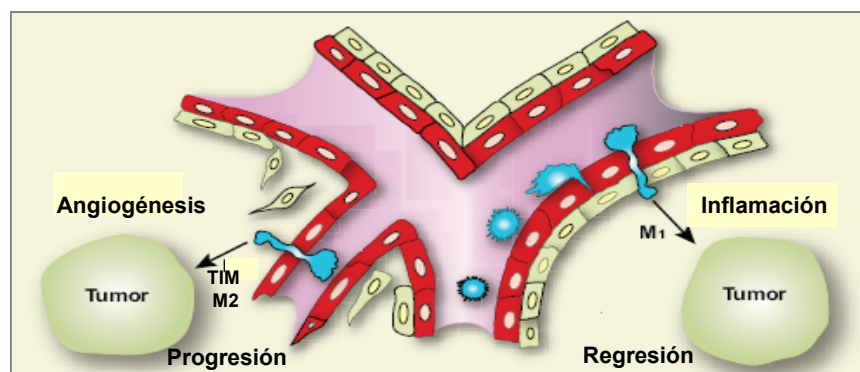


Figura I4. Función diferencial de los macrófagos enfrentados al cáncer. (Figura modificada de Lamagna, *et al*, 2006) (32).

La reprogramación de la respuesta inmune de los TIM implica muchos mecanismos que están siendo objeto de estudio, entre ellos está la regulación negativa de citocinas inflamatorias como IL-12 y TNFα, y la producción de citocinas antiinflamatorias como IL-10 (22). Además, se ha observado el papel de la familia de IRAKs en el proceso de disminución de la respuesta de los monocitos enfrentados a tumores (19). Un estudio publicado recientemente, demostró que ratones “knock-out” para IRAK-M, no desarrollaron tumores cuando se les inyectaron células tumorales (75). Es importante recordar que esta familia de quinasas está implicada en la cascada de señalización que puede inducir o frenar la respuesta inflamatoria (47, 49, 54).

Por otra parte, en un estudio se utilizó un modelo *in vitro* de co-cultivo de MØ con diversas líneas tumorales con o sin una pre-exposición a la misma línea tumoral. Se observó que estos MØ, cuando se les volvía a enfrentar con las células tumorales, presentaban una disminución en la expresión de IL-12, IRAK-1 y TNF α , Indicando que el segundo contacto del MØ con el tumor disminuye su respuesta inflamatoria (63). Otro estudio utilizando un modelo experimental similar, realizado en nuestro laboratorio, detectó que además de la disminución en la expresión de TNF α por los monocitos enfrentados dos veces a las células tumorales, ocurría un aumento en la expresión de IRAK-M, siendo este uno de los posibles mecanismos que da explicación al fenómeno. Este estudio obtuvo los mismos resultados cuando analizó la expresión de IRAK-M y TNF α en monocitos de pacientes con distintos tipos de cáncer (19).

Por otro lado, otros modelos experimentales o incluso distintos tipos de tumores de pacientes pueden presentar TIM con características distintas a los reportados en estos trabajos (69). Concluyéndose que el tiempo de exposición del MØ a la célula tumoral y el modelo experimental empleado son determinantes para establecer los perfiles de los TIM. Por otro lado, los TIM siempre presentan menor capacidad de exterminar al tumor a pesar de las variaciones en su perfil encontradas en los distintos estudios (22, 72, 74).

Por todo ello, es de crucial importancia que se siga investigando en profundidad el perfil de los TIM en diferentes circunstancias, detectando cuales son los mecanismos que llevan a los MØ a cambiar su perfil de “eficientes” a “no eficientes” contra la progresión tumoral. Últimamente se están publicando cada vez más estudios de análisis del perfil génico de TIM tanto de pacientes (69) como en modelos de ratón (11, 62). Entretanto, aún nos queda profundizar en la comparación de los perfiles génicos de monocitos circulantes, TIM y de las células tumorales, para diferenciar sus mecanismos moleculares y también para entender mejor el fenómeno de la evasión del tumor del sistema inmune y del cambio de perfil/reprogramación del MØ.

En el presente trabajo, hemos avanzado en el desarrollo del modelo experimental *in vitro* de generación de los TIM y comparamos su expresión génica con la de los MØ sanos y distintas líneas tumorales. Esta comparación nos ha permitido investigar la diferencia entre los MØ en la fase de la vigilancia inmunológica y aquellos que se encuentran en la fase de equilibrio de la “edición inmunológica” de tumores.

MATERIALES Y MÉTODOS

2. Materiales y métodos

2.1. Reactivos

Todos los reactivos utilizados, se compraron a las siguientes casas comerciales: Merck (Darmstadt, Alemania), Boehringer (Mannheim, Alemania) y Sigma (San Luis, MO, EEUU). En todos los casos, los reactivos adquiridos fueron de la mayor calidad disponible.

El medio de cultivo utilizado fue el DMEM (Dulbecco's MEM), de Invitrogen (Carlsbad, CA, EEUU). En todos los casos, el medio estaba suplementado con 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Ambos antibióticos, también procedían de Invitrogen. Todas las soluciones y medios de cultivo estaban libres de contaminación por LPS, testándolo por el test de limulus, utilizando el Limulus Amebocyte Lysate kit de Cambrex (East Rutherford, NJ, EEUU).

2.1.1. Anticuerpos y Análisis de Citometría de Flujo

Los anticuerpos utilizados en el presente trabajo, su tipo, especie de procedencia, y empresa suministradora se muestran en la Tabla M1.

Detectamos la expresión de diversas proteínas utilizando anticuerpos específicos (Tabla M1). En cada caso, para corregir las uniones inespecíficas, utilizamos un anticuerpo de control isotipo comprados de la misma casa comercial que los anticuerpos correspondientes. Lavamos las células, en suspensión, dos veces con PBS (del inglés Phosphate Buffered Saline), antes y después del marcaje. Después, las muestras se analizaron por citometría de flujo utilizando el FACScalibur (Becton Dickinson) equipado con un láser de argonio de 25-mW.

Anticuerpo	Tipo	Especie	Empresa
Anti-CD14-APC	Monoclonal	Ratón	Miltenyi Biotec (Auburn, CA, EEUU)
Anti-CD64-FITC	Monoclonal	Ratón	Becton Dickinson (San Jose, CA, EEUU)
Anti-HLAI-A2-FITC	Monoclonal	Ratón	
Anti-HLAII-DM-PE	Monoclonal	Ratón	
Anti-HLAII-DQ-FITC	Monoclonal	Ratón	
Anti-HLA-DR-APC	Monoclonal	Ratón	
Anti-CD3-PE	Monoclonal	Ratón	
Anti-CD163-PE	Monoclonal	Ratón	
Anti-CD86-APC	Monoclonal	Ratón	
Anti-TLR4-Alexa Fluor	Monoclonal	Ratón	
Anti-HLA-DR	Monoclonal, purificado NA/LE	Ratón	
Anti-TREM-1-PE	Monoclonal	Ratón	R&D (Minneapolis, MN, EEUU)
Anti-TREM-1	Monoclonal	Cabra	
Anti- β -actina	Monoclonal	Ratón	Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, EEUU)
Anti-TNF α	Policlonal	Conejo	
Anti-IRAK-M	Policlonal	Conejo	Chemicon Internacional (Temecula, CA, EEUU)

Tabla M1. Anticuerpos utilizados en análisis de citometría de flujo y Western Blot.

2.2. Cultivos celulares

Todos los datos mostrados en el presente trabajo, se obtuvieron a partir del estudio del comportamiento de MØ humanos, aislados desde buffy coats. En todos los ensayos se realizó un paso inicial de aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y una posterior purificación de MØ.

2.2.1. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica

Partiendo de buffy coats aislamos CMSP por centrifugación en gradiente de densidad, utilizando el reactivo Ficoll-Hypaque Plus de Amersham Bioscience (Piscataway, NJ, EEUU). Del total de CMSP, dependiendo de la finalidad prevista, purificamos MØ por dos métodos diferentes que especificamos a continuación.

2.2.2. Purificación de MØ por adherencia

Los MØ extraídos de buffy coats para los experimentos fueron purificados por el siguiente método. Una vez obtenidas las CMSP, las cultivamos durante dos horas en DMEM a una densidad de 5×10^6 células/ml. Después de este periodo se aspiraron los sobrenadantes, arrastrando las células no adheridas. Las adheridas se lavaron 3 veces con solución tampón PBS, y se cultivaron en el mismo tipo de medio, suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (SFB), comprado a Invitrogen (Carlsbad, CA, EEUU). Se dejaron reposar durante 16 horas, y posteriormente, se iniciaron los tratamientos oportunos.

Los cultivos se testaron con respecto a su homogeneidad, analizando la expresión superficial del marcador CD14 por citometría de flujo. Las células adheridas expresaban el marcador en un $(89 \pm 2.3 \%)$ (Media \pm Desviación Estándar; $M \pm DE$).

2.2.3. Cultivo de líneas celulares

En el presente trabajo se han usado las líneas celulares listadas en la Tabla M2, siempre de origen humano, obtenidas todas ellas de la American Type Culture Collection. En todos los casos, se testaron contra posibles contaminaciones por Micoplasma.

Nombre	Procedencia
A431	Carcinoma epidérmico
BXPC3	Adenocarcinoma epitelial pancreático
Hela	Carcinoma epitelial de cérvix
SKBR3	Adenocarcinoma epitelial de mama

Tabla M2. Líneas celulares utilizadas.

2.3. Co-cultivos y posterior aislamiento de MØ humanos

MØ humanos se co-cultivaron con las diferentes líneas celulares indicadas en la Tabla M2, a una proporción de 1:0.3 (MØ: línea celular) durante los tiempos indicados en las figuras correspondientes.

Después de las incubaciones oportunas, se recolectaron todas las células y se aislaron magnéticamente aquellas que expresaban el marcador CD14, como se explica en el epígrafe siguiente. Seguidamente, se sometió a la población celular aislada a los tratamientos oportunos, ya sean un nuevo cultivo, co-cultivo o extracción de material genético.

2.3.1. Purificación magnética de MØ después de los co-cultivos

Se aislaron las células CD14⁺ a partir de los MØ humanos co-cultivados o controles. Se utilizó el sistema de separación positiva LS-positive Separation Column System de Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Alemania), con un anticuerpo anti-CD14 conjugado con “perlas” magnéticas, siguiendo las indicaciones del fabricante. Tras el aislamiento, las células se lavaron 3 veces con PBS y se sometieron a los tratamientos oportunos.

Analizamos la pureza de la población obtenida por citometría de flujo, marcando las células con un anticuerpo anti-CD14-APC, obteniendo una pureza de la población de ($94 \pm 3.1 \%$) ($M \pm DE$)

2.3.2. Comprobación de la pureza de células CD14⁺ posterior al aislamiento

2.3.2. a) Proliferación de células CD14⁺

Después del aislamiento de células CD14⁺ cultivamos 2×10^6 de estas células y de las líneas tumorales (como control positivo) y observamos su proliferación durante 15 días. Cada día se despegaron las células con tripsina (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU), se hicieron diluciones en azul Tripan y se realizó el recuento microscópico de las células con el uso de la cámara de Neubauer.

2.3.2. b) Inyección de células CD14+

Después del aislamiento de células CD14+ inyectamos subcutáneamente en la pata posterior 2×10^6 / 50µl de estas células a 6 ratones inmunosuprimidos de la cepa *Foxn1nu*. Se inyectaron también células HeLa como control positivo a 5 ratones y PBS como control negativo a 3 ratones y los otros 2 animales no recibieron ningún tratamiento. Se realizó un seguimiento de 2 meses, registrándolo a través de fotos.

Se siguieron exactamente las normas del Comité de Bioética y Bienestar Animal del Instituto de Salud Carlos III (RD 1201/2005) para todo el procedimiento realizado con estos ratones así como para las condiciones de su mantenimiento.

2.4. Aislamiento de ARN y proteínas

Después de cada uno de los tratamientos a los que se expusieron los cultivos de MØ humanos, se lavaron tres veces con solución tampón PBS y extrajimos el ARN. Para obtener el ARN total de estas células utilizamos el reactivo TRI-Reagent de Sigma (San Luis, MO, EEUU), siguiendo las indicaciones del fabricante. El ARN aislado fue tratado con DNasa I libre de RNAsas de Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, EEUU), obteniendo la muestra de ARN de partida para sintetizar ADN complementario. Previamente, fue cuantificado por espectrofotometría ultravioleta.

El reactivo TRI-Reagent permite aislar de una misma muestra biológica, ARN, ADN y proteínas. Purificamos la fracción proteica, siguiendo las indicaciones proporcionadas por Sigma. Los precipitados proteicos finales, se disolvieron en una solución de SDS al 1 %. Finalmente, cuantificamos las proteínas obtenidas utilizando el kit BCA Protein Assay de Pierce (Rockford, IL, EEUU). Para los Western Blot de TREM-1 soluble se utilizaron sobrenadante de los cultivos celulares y se normalizó con la tinción de la membrana de nitrocelulosa con rojo Ponceau.

2.4.1. Cuantificación del ARN mensajero

Partiendo de 1 µg de ARN libre de ADN obtenido según el punto anterior, sintetizamos ADN complementario utilizando el kit First-strand cDNA synthesis de Roche (Palo Alto, CA, EEUU), en base a oligonucleótidos poli(T).

Los niveles de expresión de cada uno de los genes estudiados en el presente trabajo, se analizaron en ese ADN complementario en reacciones de PCR cuantitativa (Q-PCR) en tiempo real. Para ello utilizamos el sistema LightCycler de Roche. Las reacciones de Q-PCR se realizaron utilizando el kit Fast-Start DNA Master SYBR Green system, también de Roche y los cebadores específicos detallados en la Tabla M3. Todos los cebadores fueron sintetizados, desalados y purificados mediante HPLC por Bonsai Biotech (Alcobendas, Madrid).

Los resultados obtenidos para cada uno de los genes analizados, se normalizaron con respecto a la expresión del gen codificante para la β -actina. El número de copias de ADN complementario de cada uno de los genes de interés, se determinó usando una curva estándar de siete puntos específica para cada gen. Los coeficientes de correlación (r^2) de estas curvas, para ser aceptadas como válidas fueron siempre > 0.98 . Las curvas se realizaron en paralelo para cada reacción de Q-PCR, además de las muestras en las que se deseaba cuantificar la expresión.

Para confirmar la especificidad de los productos de la reacción en cada experimento, se analizaron los perfiles de “melting” o desnaturalización de cada grupo de muestras, utilizando el LightCycler. Estos perfiles se determinaron manteniendo la reacción a 80 °C durante 10 segundos y entonces, calentando hasta 95 °C a una tasa de calentamiento de 0.1 °C / segundo. A lo largo de este proceso, se medía la fluorescencia emitida de manera continua. Este análisis demostraba que para cada par de cebadores, el producto de la amplificación era un único amplicón.

Al finalizar cada reacción de Q-PCR, los productos de la amplificación se separaron por electroforesis en geles de agarosa, tiñéndolos con bromuro de etidio (0.5 μ g/ml) y observándolos por transiluminación ultravioleta. En todos los casos se verificó que para cada par de cebadores, el producto de amplificación era una única banda del tamaño esperado.

Gen	Cebador Sentido (5' → 3')	Cebador Antisentido (5' → 3')	Temperatura de Hibridación (°C)
β-actina	AAGAGCTACGAGCTGCCTGACG	TCCACATCTGCTGGAAGGTGG	55
TNFα	AAGAGCTACGAGCTGCCTGACG	TCCACATCTGCTGGAAGGTGG	64
IL-12p40	GACATTCAGTGTCAAAGCAGCA	CCTTGTTGTCCCCTCTGACTCT	64
IL-23p19	GTTCCCCATATCCAGTGTGG	GAGGCTTGGAATCTGCTGAG	60
IL-6	CAAAGAATCTAGATGCAATAA	GCCCATTAACAACAACAATCTG	60
LIF	GTCACTTGGCATTCAAGGCTCTG	GTCACTTGGCATTCAAGGCTCTG	60
TREM-1	GGACGGAGAGATGCCCAAGACC	ACCAGCCAGGAGAATGACAAATG	60
IRAK-M	TTTGAATGCAGCCAGTCTGA	GCATTGCTTATGGAGCCAAT	59
IL-10	ATGCCCCAAGCTGAGAACCA	TCTCAAGGGGCTGGGTCAGC	58
NF-κB2/p100	TACCGACAGACAACCTCACC	CCTCAGCAGCCTCACTCC	54
HLA-DQ β1	TGACCTTGATGCTGTCGATGCTGA	AAGCGCACGATCTCTTCTCGGTTA	62
HLA-DR β1	TGTTCTCCAGCATGGTGTGCT	TGATGCTGCCTGGATAGAAACCACTCA	57
CIITA	AATTTGGCAGCACGTGGTACAGGA	TCTGCACAAGCTTTCCCAGGTTCTT	60
CIITA I	TGCACTCTGCTCCATGAGCCTGATA		
CIITA III	ATTCCTACACAATGCGTTGCCGGCT		
CIITA IV	GGAGGGAGAGGCCACCAGCA		

Tabla M3. Secuencia de cebadores utilizados y sus respectivas temperaturas de hibridación, en Q-PCR.

2.5. Ensayos de Microarrays

2.5.1. Amplificación y marcaje de ARN

Seguimos el protocolo de Agilent Technologies (One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Protocol, Palo Alto, CA, EEUU) para la amplificación del ARN marcado. De manera resumida, 200-700 ng de ARN fue transcrito utilizando el cebador del promotor T7 y MMLV-RT. Después el ADNc fue convertido en ARNa

utilizando la T7 ARN polimerasa, que amplifica el material diana e incorpora el marcaje de cianina 3-CTP (Cy3).

2.5.2. Protocolo de Hibridación, lavado, scan y análisis de imágenes.

Hibridamos las muestras al Whole Human Genome Microarray 4 x 44K (G4112F, Agilent Technologies). Se hibridó 1,65µg de aARN marcado con Cy3 durante 17 horas / 65°C / 10 rpm en una concentración final de 1X en solución tampón GEx Hybridization Buffer HI-RPM, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Protocol).

Los arrays se lavaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante (One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Protocol). Posteriormente secamos los arrays por centrifugación.

Los arrays se escanearon en el Microarrays Scanner (G2565BA, Agilent Technologies) utilizando los parámetros por defecto para el formato de 4 X 44K para arrays de un color. Los análisis de las imágenes se hicieron utilizando el software Feature Extraction, versión 9.5.3.1 (Agilent Technologies).

2.5.3. Análisis estadísticos de los microarrays.

Los archivos obtenidos de Feature Extration fueron importados al software GeneSpring® GX versión 9.0. (Agilent Technologies). Se hizo la normalización cuantil y el valor de expresión se obtuvo para cada sonda (transformado a log2). Las sondas también fueron caracterizadas como *Presente* o *Marginal* en 75% (a través del GeneSpring®) de las muestras en los ocho experimentos (dos por línea tumoral) y se les seleccionaron para los análisis posteriores (22726 sondas).

Los valores de expresión fueron calculados según la proporción entre MØ de cada experimento y las muestras.

Para los análisis posteriores se utilizaron dos softwares; el GEDI (Gene Expression Dynamics Inspector) y el Ingenuity (Ingenuity Systems®, www.ingenuity.com).

El GEDI es un software que se basa en la organización de clusters por SOM (del inglés Self Organizing Maps). Cada grupo de K genes fue estructurado en clusters N x M basados en la similitud de expresión de muestras pertenecientes a condiciones

experimentales distintas. Estos grupos de K genes fueron, entonces, colocados en sitios cercanos entre ellos dentro de los mapas GEDI. Este software es capaz de organizar las muestras en mosaicos bidimensionales de tamaño N x M, donde cada cuadrado de color (píxel) corresponde al valor del centraloide de cada cluster, en una muestra particular. De esta manera, se organizaron mapas del transcriptoma de cada condición experimental que nos permitió una visión global del movimiento de los genes llamado “*global análisis*” (76, 77).

Adicionalmente, los genes que presentaron valores de expresión (calculados como descrito anteriormente) con un patrón particular fueron analizados funcionalmente por el software Ingenuity a través de la selección de clusters de interés, llamado “*gene-centered analysis*”.

2.6. Análisis por Western Blot

Las proteínas obtenidas (ver punto 2.4) se desnaturalizaron por calentamiento a 95 °C durante 5 minutos en solución tampón Laemmli. Posteriormente se separaron por electroforesis en geles al 12 % de SDS-poliacrilamida, en tampón Tris-glicina-SDS (25 mM Tris-HCl, 250 mM glicina, 0.1 % SDS). Al finalizar la separación, transferimos las proteínas a membranas Immun-Blot PVDF de Bio-Rad (Hercules, CA, EEUU), aplicando una corriente eléctrica de 300 mA durante 1 hora y media a 4 °C.

A partir de este punto, todos los procesos se realizaron en agitación. Las membranas se bloquearon durante una hora con 5% de leche desnatada disuelta en solución tampón TTBS (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.2 % Tween 20), lavándolas posteriormente tres veces con la misma solución. Después de los lavados, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios oportunos (anti-IRAK-M, anti-TNF α , anti-TREM-1 y anti- β -Actina), diluidos según las indicaciones del fabricante, en TTBS durante 16 horas a 4 °C. Después de tres nuevos lavados con TTBS, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes, conjugados con peroxidasa, durante 45 minutos, de nuevo en TTBS. Posteriormente, se lavaron las membranas tres veces con la misma solución.

Finalmente, detectamos los anticuerpos unidos utilizando el reactivo quimioluminiscente ECL Plus de Amersham Bioscience (Piscataway, NJ, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.7. Ensayo de Fagocitosis

El ensayo de fagocitosis se hizo siguiendo el protocolo de Gosain, *et al*, 2007, con pocas modificaciones (78). Bacterias *E.coli* DH5 α que expresan GFP (del inglés Green Fluorescence Protein) inducido por IPTG clonado en el plásmido pGT (obtenido a través del Dr. Steven Lindow, Universidad de California, Berkeley) crecieron en medio LB con ampicilina (50g/ml) e IPTG (1mM) en un incubador con agitación a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente, las bacterias se centrifugaron (1850xg, 10 minutos) y lavadas con PBS tres veces. El cultivo se resuspendió en PBS hasta llegar a una densidad óptica de 1,3 – 1,5, a 665 nm de longitud de onda ($\cong 10^8$ bacterias/ml). Las bacterias fueron mantenidas en la oscuridad a 4°C (si no es así cabe pensar que si tardas mucho en utilizarlas sigan creciendo) hasta su uso para el ensayo de fagocitosis.

Se sembraron placas que contenían una densidad de 1×10^6 de MØ humanos (CD14+ obtenidos de los co-cultivos, ver punto 2.3.), previamente sometidas al tratamiento correspondiente, se lavaron dos veces con PBS. Posteriormente se incubaron con 100 μ l de la suspensión de bacterias 1 hora / 37°C en oscuridad. Después se paró el proceso de fagocitosis añadiéndose 1 ml de PBS frío. A continuación los MØ se lavaron dos veces con PBS frío y fueron expuestos a 1mg/ml de lisozima en PBS a temperatura ambiente durante 30 minutos en agitación para eliminar del medio las bacterias no fagocitadas. Seguidamente las células adheridas fueron lavadas dos veces con PBS frío y analizadas por citometría de flujo o microscopia fluorescente. En citometría de flujo la intensidad de GFP fue medida definiendo la población de células CD14+. Las células utilizadas para microscopia fueron montadas en preparaciones en porta objetos en solución *antifade* de Vector Laboratories (Burlingame, CA, EEUU) y analizadas en microscopio de fluorescencia DMI6000 B (Leica Microsystems; Wetzlar, Alemania).

2.8. Ensayo de proliferación de Linfocitos

Hicimos un ensayo alogénico de proliferación de linfocitos, para comprobar la capacidad presentadora de antígenos de los MØ (79, 80). Linfocitos heterólogos humanos, considerados una población celular no adherente en nuestro protocolo de aislamiento de MØ, se marcaron con la tinción PKH2 (Green Fluorescence Cell Linker Kit, Sigma). Posterior a cada co-cultivo y aislamiento de células CD14+ los linfocitos

teñidos fueron añadidos a las placas de cultivo de los MØ en la proporción 1:5 (MØ : LØ). Después de tres días, las células no adheridas fueron recolectadas, marcadas con anti-CD3-PE y adquiridas por citometría de flujo. La proliferación de linfocitos fue medida según la pérdida de la tinción verde PKH2 para las células CD3+; para estos análisis, los cultivos de linfocitos solos fueron utilizados como control.

Como se indica en la figura de Resultados, después de volver a sembrar las células CD14+ que habían sido co-cultivadas con células tumorales, se les trató a estos MØ con 5µg anticuerpo bloqueante anti-HLA-DR (Becton Dickinson, San Jose, CA, EEUU) durante 2 horas en incubador a 37°C, en las condiciones de cultivo. Después, se lavó estas células adheridas a placa con PBS y se prosiguió con el mismo protocolo de ensayo de proliferación de linfocitos citado anteriormente en este punto.

2.9. Análisis estadísticos

El número de réplicas para cada uno de los experimentos realizados fue de tres en los casos de análisis de expresión transcripcional, de análisis de expresión proteica o de los ensayos de proliferación de linfocitos y fagocitosis. Para cada experimento donde analizamos la expresión de diversos genes por Q-PCR, Western Blot y citometría de flujo partíamos de los datos arrojados por las tres réplicas para calcular las medias y desviaciones estándar. Con estos parámetros, aplicando el estadístico T de Student, consideramos una significación estadística en las diferencias de expresión observadas, para valores de $p < 0.05$. Esta significación se indica en las figuras con (*).

En los casos de experimentos en base a la técnica de Western blot, se muestra el resultado de uno de los dos geles realizados por experimento, considerado como significativo del efecto observado.

RESULTADOS

3. Resultados

3.1. Validación del modelo de TT¹ *in vitro*

Como ya ha sido demostrado por varios autores (20, 47, 63, 81), los MØ infiltrados en los tumores pierden su actividad antitumoral en comparación con aquellos que se enfrentan por primera vez a una célula cancerígena. Estos estudios confirman que la pérdida de la actividad antitumoral se ve reflejada, entre otros aspectos, en la bajada de la producción de TNF α (19, 63) y otras citocinas (22, 74) responsables de inducir la respuesta inflamatoria y de activar el sistema inmune adaptativo (Figura R1A). Sin embargo, existen estudios donde no se ha observado una regulación negativa de la expresión de TNF α por MØ enfrentados a tumores (19, 74). Discutiremos seguidamente algunas variaciones en la expresión de citocinas por MØ infiltrados en tumores. Estas variaciones tienen una importancia crucial para el estudio de la respuesta inmune frente a tumores, y pueden depender del microambiente tumoral o del modelo empleado para estudiarlo.

Previamente, en nuestro laboratorio se desarrolló un modelo a partir de los datos publicados por Zembala, *et al.* (63) que simula *in vitro* la generación de los TT (19). En este modelo, se observó que el MØ enfrentado a la línea de carcinoma epidérmico A431 presenta un aumento en la expresión de TNF α ; situación que se revierte cuando el MØ se vuelve a enfrentar a la célula tumoral (Figura R1B). Estos datos sugieren que un segundo contacto con la célula tumoral, el cuál simula la infiltración del MØ al tumor, hace que el TT pierda la capacidad de inducir una respuesta inflamatoria (Figura R1A y B).

Tomaremos estos datos como base de partida para analizar, con más detalle, el perfil de estas células utilizando un modelo *in vitro* de generación de los TT, profundizando en aquél desarrollado en nuestro laboratorio (19).

¹ En lo sucesivo utilizaremos: T para designar a los MØ de activación clásica o M1 y TT para nombrar a los MØ de activación alternativa o M2. De acuerdo con la nomenclatura que nos indica una (T) o dos (TT) exposiciones a la línea tumoral.

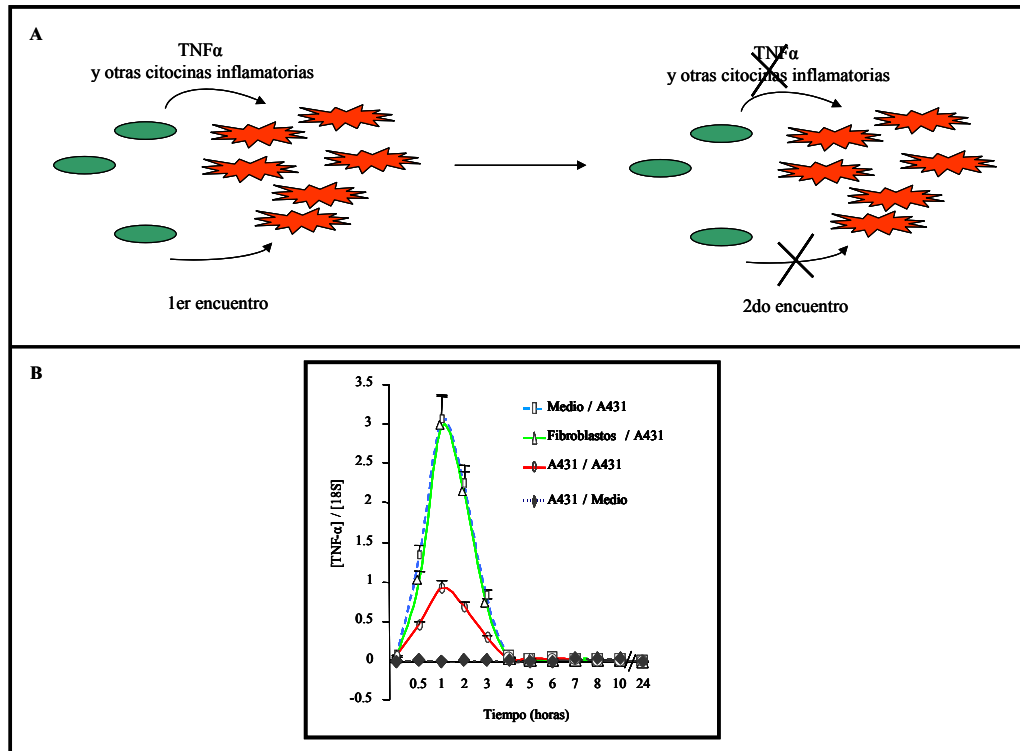


Figura R1. Validación del modelo TT in vitro

(A) Representación gráfica del MØ enfrentado al tumor. Los MØ activan una respuesta inflamatoria frente a las células tumorales, la cuál desaparece en un segundo encuentro con el tumor. (B) Expresión de TNF α en el modelo de generación de TT. MØ humanos se co-cultivaron con fibroblastos, células A431 o se dejaron en medio durante 6 horas. En ese momento se aislaron magnéticamente las células CD14 $^{+}$, se lavaron 3 veces con PBS y se volvieron a cultivar en medio o se co-cultivaron con células A431. A los tiempos indicados se aislaron nuevamente las células CD14 $^{+}$, se obtuvo el ARN total de ellas y por Q-PCR valoramos la expresión de TNF α y 18S, analizando la relación TNF α / 18S (Datos ya publicados, del Fresno, et al, 2005).

De esta manera, en el modelo utilizado en el presente trabajo se expusieron los MØ aislados de sangre periférica a diferentes líneas tumorales. Como se expone en Material y Métodos (M & M), las líneas tumorales utilizadas fueron: A431, HeLa, BXP3 y SKBR3 (Ver especificaciones en M & M). Quisimos utilizar líneas tumorales de orígenes distintos, intentando que fuera lo más representativo posible dentro de la gama de cánceres que se padecen en nuestra sociedad. Por ello el criterio de selección

de dichas líneas tumorales fue el tipo de cáncer que las originó, y si las mismas provinieron de un tumor primario o metastático.

En este modelo se utilizaron dos tipos de “estímulos” denominados T y TT. En el estímulo proinflamatorio (o T) los MØ se co-cultivan con las células tumorales durante 3, 6 o 24 horas en la proporción 1:0,3 (MØ; células tumorales), luego se aislaron magnéticamente las células CD14+, las cuales fueron utilizadas en análisis de expresión génica por microarrays de ARNm (ver Tabla R1 y Figura R2). En cambio, en el modelo TT el primer encuentro con el tumor se simuló con un co-cultivo de MØ y células tumorales durante 6 horas (en la misma proporción que en T). Luego, los MØ CD14+ se aislaron magnéticamente; y una vez lavados se volvieron a co-cultivar con el mismo tipo de célula tumoral durante 3, 6 o 24 horas. Posteriormente a estos tiempos, volvimos a aislar los MØ de la misma manera y efectuamos los análisis de expresión génica por microarrays de ARNm (Tabla R1 y Figura R2).

En base a esto, se generan dos condiciones experimentales básicas y dos controles de cada uno de los experimentos (ver Tabla R1):

- Control MØ: son los monocitos que no reciben estímulos, es el control de la actividad basal.
- Control Tumoral: Células tumorales sin recibir ningún estímulo. Este control nos permite comparar el perfil de los T y TT con el de las células tumorales.
- Tratamiento (T): Simulación del encuentro inicial del MØ con el tumor. Aquí se pretende inducir el perfil inflamatorio de los MØ enfrentándoles con la célula tumoral una vez, durante 3, 6 o 24 horas.
- Tratamiento (TT): Simulación de la infiltración del MØ en el tumor. Después del primer contacto con la célula tumoral durante 6 horas, los MØ CD14+ son aislados, lavados y se les vuelve a enfrentar a las células tumorales (3, 6 o 24 horas). Con el segundo estímulo, se inducen las características que tienen los MØ infiltrados en tumores.

Condición	Pre- exposición	Separación (CD14+)	Lavado	Exposición	Separación (CD14+)
Ø	medio	-	3x PBS	medio	+
T	medio	-	3x PBS	línea tumoral	+
TT	línea tumoral	+	3x PBS	línea tumoral	+

Tabla R1. Estructura del modelo T / TT.

En todos los casos la pureza de los MØ fue comprobada por citometría de flujo, presentando una media de 94% de células CD14 positivas (Figura R3).

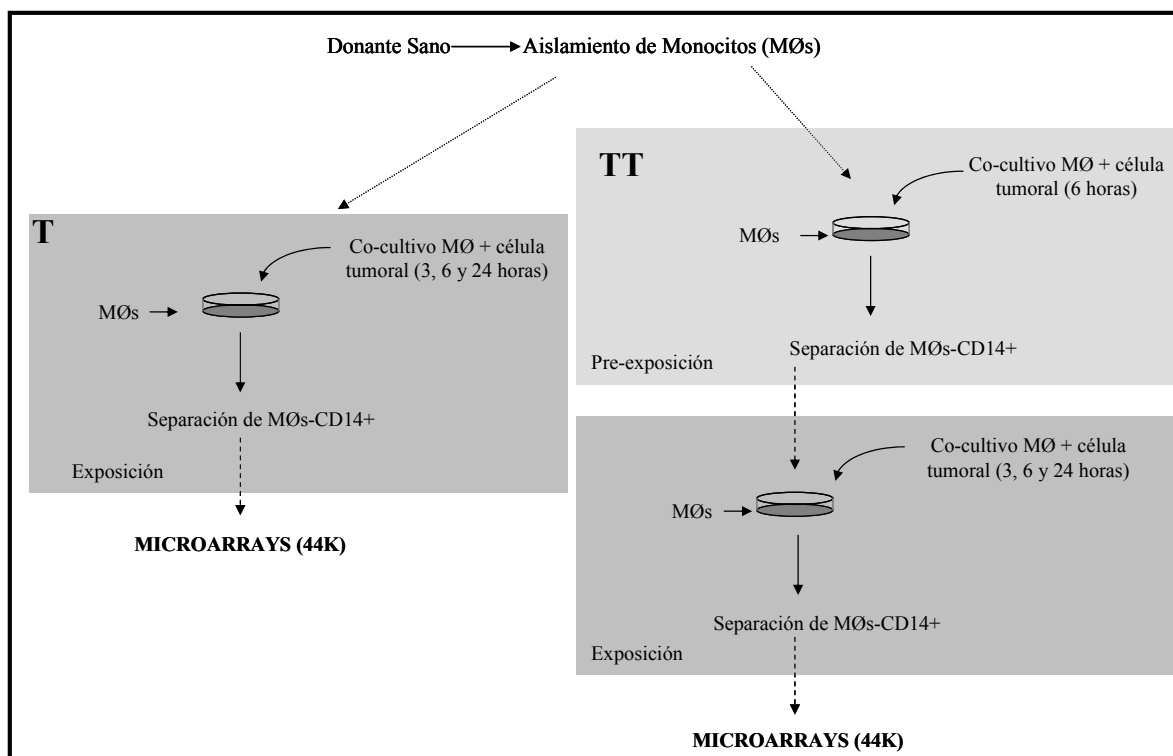


Figura R2. Representación esquemática del diseño experimental.

MØ humanos se co-cultivaron con las líneas tumorales A431, HeLa, BXPC3 o SKBR3 en la proporción 1:0,3 (MØ:célula tumoral) durante los tiempos indicados. Después del co-cultivo los MØ CD14⁺ fueron aislados y analizados mediante microarrays (T). En TT, el aislamiento de células CD14⁺ (a las 6 horas del estímulo), fue seguida del co-cultivo en los mismos tiempos que en T. Luego se volvió a aislar los MØ CD14⁺ para los análisis por microarrays.

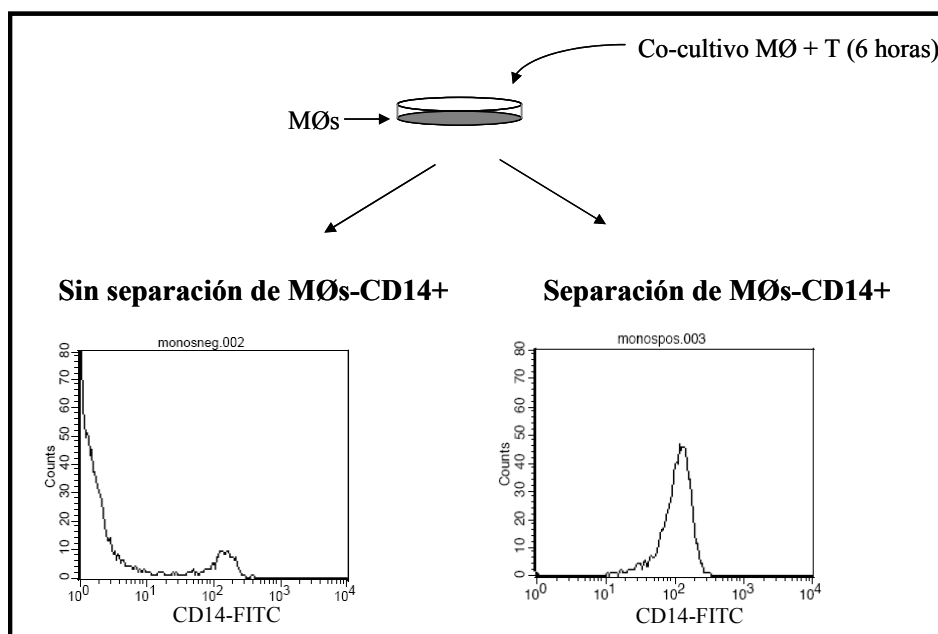


Figura R3. Representación esquemática del aislamiento de MØ tras los tratamientos T y TT y comprobación de su pureza.

La pureza de los MØ CD14⁺ se comprobó por citometría de flujo utilizando un anticuerpo específico para la molécula de superficie. Se hizo la comprobación a todos los experimentos, incluso a los MØ controles. Se muestran dos histogramas típicos.

Una vez comprobada la pureza de los MØ CD14⁺, se procedió a la validación de nuestro modelo a través de análisis preliminares de expresión de genes de interés. En la figura R4A se puede apreciar que después de los estímulos de 6 horas, los MØ presentan una disminución en la expresión de TNF α cuando son enfrentados a todas las líneas tumorales utilizadas en este estudio. Esta disminución es menos evidente en el caso del enfrentamiento con las células HeLa aunque estadísticamente significativa.

Como los TT están caracterizados por su baja expresión de citocinas pro-inflamatorias y/o inductoras de la activación de linfocitos, como IL-12 e IL-23 (62, 63, 74) decidimos comprobar si en nuestro modelo se reproducía este perfil. Constatamos que los TT (6 horas), presentaban una disminución de la expresión de IL-12p40 e IL-23p19, en comparación con los T (Figura R4 B y C).

Una vez caracterizados los T y TT, en cuanto a la expresión de las citocinas más comunes en este tipo de estudio (20, 69, 81), procedimos a verificar los cambios en sus perfiles génicos en función del tiempo. Para ello hicimos experimentos como lo indicamos en la tabla R1, en un principio solamente con células HeLa. En la figura R4D

se puede apreciar que tanto los T como en el TT presentan una expresión máxima de TNF α a las 6 horas. Sin embargo, los TT tienen niveles de esta molécula significativamente inferiores comparados a los T (3 veces menos). A las 24 horas los T y TT, vuelven a restaurar la expresión basal de TNF α (Figura R4D).

Teniendo en cuenta el interés que supone confirmar los cambios graduales que sufren los MØ en función del co-cultivo y el tiempo de exposición a las células tumorales, elegimos este modelo experimental como el mejor para estudiar el perfil génico de los T y TT.

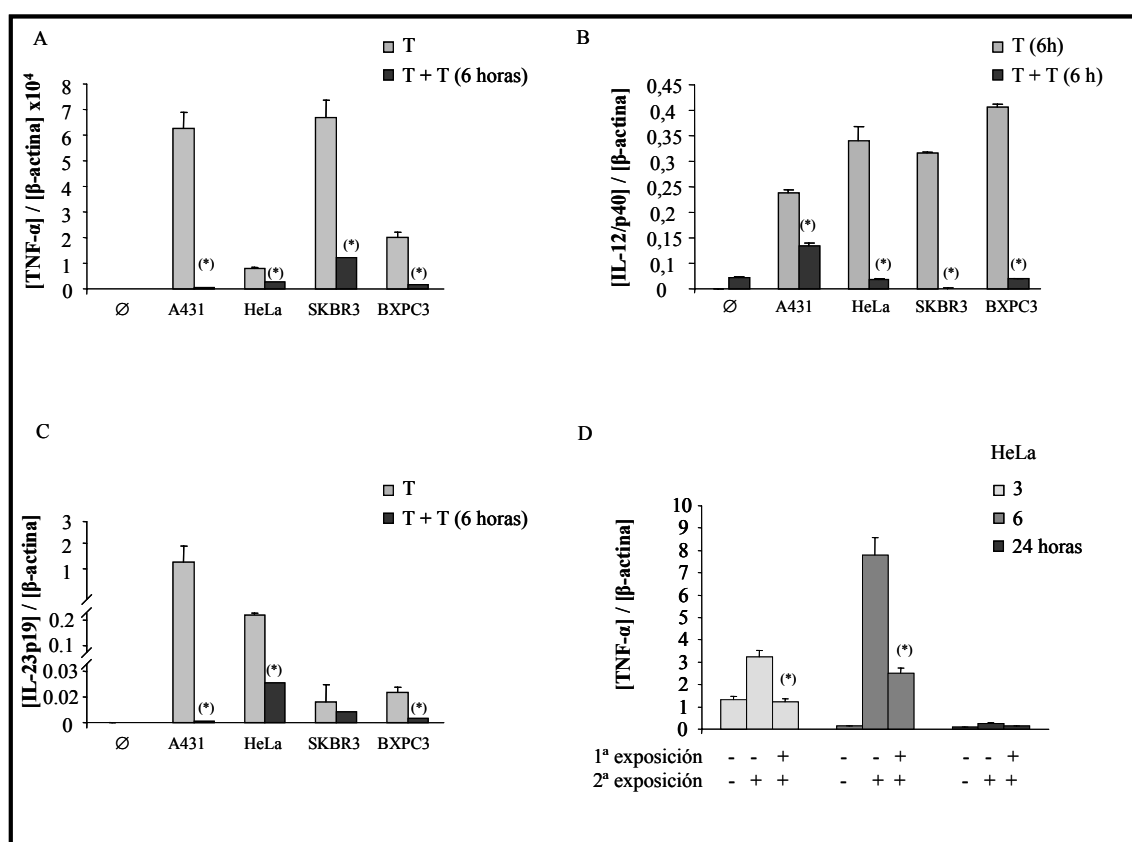


Figura R4. Expresión de citocinas pro-inflamatorias a nivel transcripcional.

MØ humanos se co-cultivaron una (T) o dos veces (TT) con las líneas tumorales indicadas, durante 6 horas. Se aislaron las células CD14⁺, se aisló el ARN total y por Q-PCR a tiempo real, valoramos la expresión de (A) TNF α , (B) IL-12p40, (C) IL-23p19. Analizamos la relación gen / β -actina. n=3, (*) $p < 0,05$ de TT con respecto a T.) En (D) se analizó la expresión de TNF α en función del tiempo en los T y TT co-cultivamos con la línea celular HeLa. Se analizó la relación TNF α / β -actina, n=3. (*) $p < 0,05$ de TT con respecto a T.)

3.2. Perfil transcripcional de MØ humanos enfrentados a células tumorales

Una vez establecido el modelo T/TT y comprobadas sus diferencias de expresión en cuanto a TNF α , IL12p40 e IL23p19 por Q-PCR a tiempo real, se hicieron los análisis de microarray de ADNc a las células sometidas en todas las condiciones experimentales descritas en el punto anterior. Todos los resultados de los microarrays se basaron en la comparación de la expresión de los MØ controles con la de los T, TT y líneas tumorales. Consideramos la expresión de aquellos genes que presentan un cambio ± 2 veces respecto a la expresión de los MØ controles.

La figura R5 muestra el modelo del mapa obtenido por el software GEDI (del inglés Gene Expresión Dynamic Inspector) que se origina de los ensayos de microarrays. Este software es capaz de organizar las muestras en mosaicos bidimensionales, donde cada cuadrado de color (píxel) corresponde al valor del centraloide de cada cluster, en una muestra particular. De esta manera, lo que se ve en la Figura R5 son mapas del transcriptoma de cada condición experimental que nos genera una visión global del “movimiento” de los genes (77), entendiendo por “movimiento” cambio de expresión. Es importante en un estudio como este obtener la visión global del “movimiento” de los genes, ya que son muchos los que cambian su expresión en nuestros análisis de microarrays, de esta manera los mapas GEDI nos facilitaron el análisis. El gradiente de colores del GEDI está representado en la figura R5. Los tonos más intensos corresponden a los cambios en la expresión con respecto al control. En este sentido, el color rojo significa aumento y el azul una disminución en la expresión de determinado gen. Dentro de este espectro, los colores menos intensos significan que el gen en cuestión no presenta cambios de expresión, con respecto al control. En la figura R6 se pueden apreciar los análisis hechos a través del programa de GEDI que, como comentamos anteriormente, nos permite tener una visión global del transcriptoma de T y TT.

Lo primero que se puede valorar, es que hay un “movimiento” de genes muy similar en las distintas muestras de T y TT, aún cuando se utilizan diferentes tipos de líneas tumorales. Además, las réplicas de cada ensayo muestran patrones muy similares, indicando la consistencia de nuestros datos. De esta forma, se pueden distinguir clusters en los que existe una diferencia de expresión entre los T o TT (Figura R6).

Sorprendentemente, en todos los experimentos los TT a las 24 horas empiezan a tener el perfil similar al de las células tumorales utilizadas (Figura R6, comparar los

mapas GEDI de TT 24 horas con las respectivas líneas tumorales). Esto indica que por alguna razón que todavía desconocemos, los MØ que se infiltran en tumores empiezan a presentar un patrón de expresión de ARNm que tiene alguna similitud con el de los tumorales.

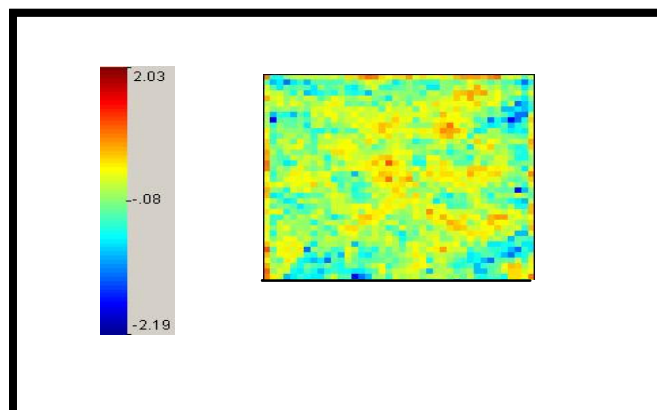


Figura R5. Modelo del mapa GEDI.

En el gradiente de tonos más intensos corresponden a los cambios de expresión, y los menos intensos significan que no hubo cambio en la expresión, comparado con la muestra considerada como control (MØ). El rojo corresponde a un aumento en la expresión, mientras que el color azul, significa la baja expresión de un determinado gen.

Para descartar que la similitud observada entre los perfiles de las líneas tumorales y TT (24 horas) pudiera ser alguna contaminación de células tumorales en el aislamiento de las células CD14+, tras el segundo co-cultivo; volvimos a sembrar la fracción positiva del aislamiento (células CD14+) y la fracción negativa (las células tumorales) después de la separación, y estudiamos su proliferación en el tiempo (Figura R7A). Por otra parte, inyectamos subcutáneamente una alícuota de los CD14+ del ensayo anterior y de células HeLa (2×10^6) en ratones inmunosuprimidos (cepa *Foxn1nu*) e hicimos un seguimiento de estos animales para ver el posible desarrollo de tumores (Figura R7 B).

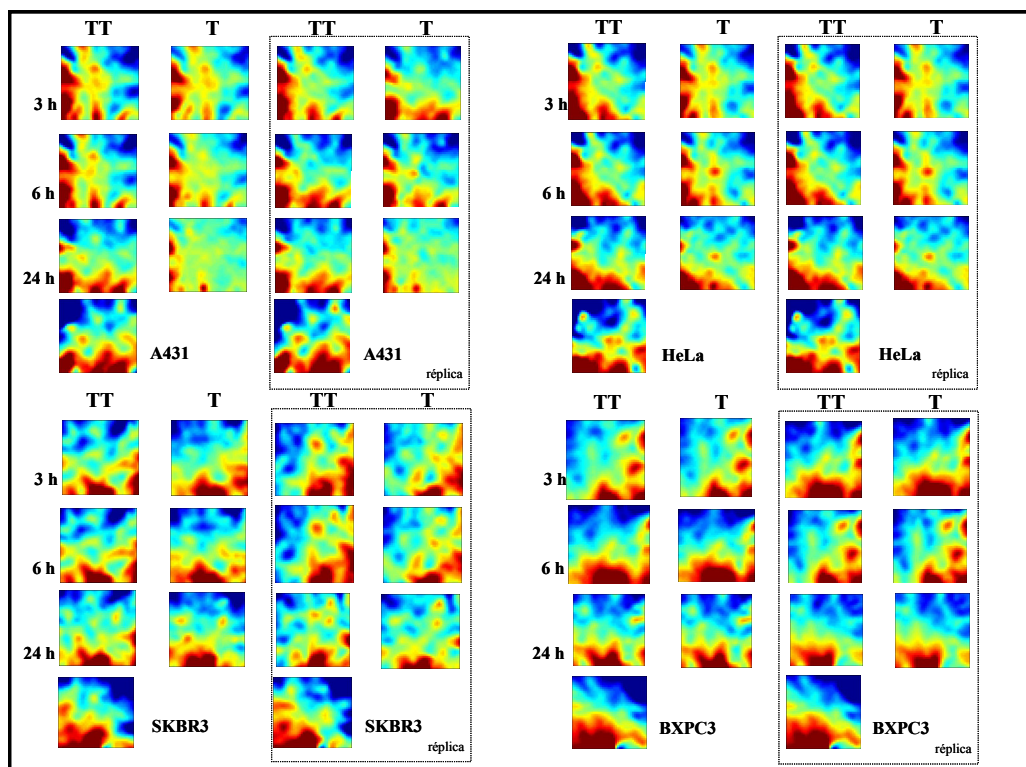


Figura R6. Mapas GEDI del transcriptoma obtenidos de los análisis de microarrays. Los MØ CD14⁺ se aislaron después de someterse a las condiciones experimentales T y TT. Luego se les aisló el ARN total para los análisis de microarrays (Material y Métodos). La figura muestra la representación gráfica de los experimentos hechos con todas las líneas tumorales. Los niveles de expresión de cada muestra fueron normalizados según los resultados de microarrays de los MØ controles (ver Material y Métodos). Cada “mosaico” es un mapa GEDI correspondiente a las muestras de T, TT o a las líneas tumorales. Los mapas GEDI de cada experimento llevan al lado su réplica experimental, para su comparación visual. Estos son los resultados de dos experimentos hechos con cada línea tumoral, n=2.

La gráfica de la figura R7A corresponde a la proliferación celular *in vitro* en escala temporal. Es considerado “tiempo cero” el día que se sembraron las células (2×10^6 por placa). Se puede apreciar que los MØ, que fueron aislados después de sometidos a la condición experimental TT (24 horas), no tienen capacidad proliferativa al contrario de las células tumorales que muestran dicha capacidad durante los 14 días de cultivo (Figura R7A). En el caso de la comprobación a través de los ensayos *in vivo*, los ratones no desarrollaron tumores cuando se les inyectó los MØ CD14⁺ (TT 24

horas), incluso después de 2 meses de la inyección (Figura R7B). Contrastando con lo observado cuando se les inyectan células HeLa. Estos datos demuestran que el aislamiento de MØ es eficiente y que no contiene contaminación de células tumorales, corroborando los resultados de citometría de flujo (Figura 3).

Después de la comprobación de la pureza de los TT 24, llevamos a cabo los análisis obtenidos en nuestros ensayos de microarrays.

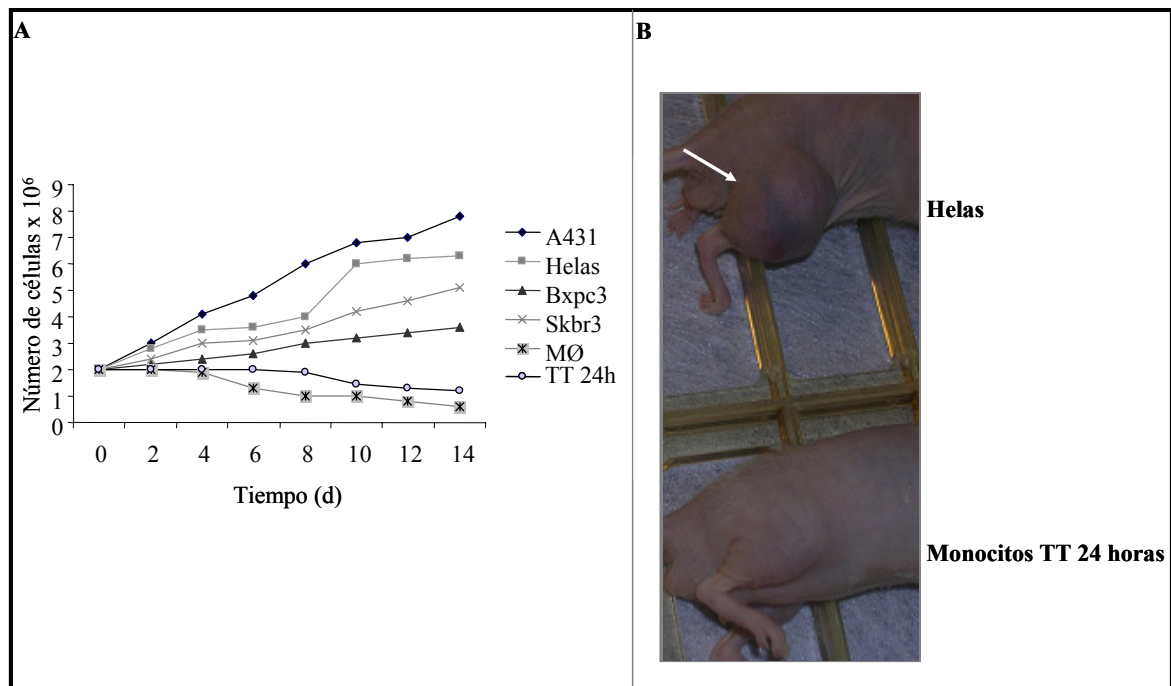


Figura R7. Pureza del aislamiento de MØ CD14+ in vivo e in vitro.

(A) Ensayo in vitro de proliferación celular en función del tiempo (d, días). Se cultivaron MØ y líneas tumorales utilizados en todos los experimentos (2×10^6 células / placa). MØ CD14+ se aislaron después de someterse a la condición experimental TT (24 horas). También se cultivaron MØ controles. (B) Inyección subcutánea de células (2×10^6) en ratones inmunosuprimidos. Se inyectó a los ratones células tumorales HeLas y MØ CD14+ aislados después de someterse a la condición experimental TT (24 horas). El crecimiento del tumor fue seguido durante 2 meses de la inyección de las células. La foto es representativa de los experimentos de inyección hechos ($n=16$) y muestra el crecimiento del tumor de ratones inyectados con células HeLas o MØ (TT 24 horas).

3.2.1 Clusters diferenciales entre T y TT obtenidos de los ensayos de Microarrays

Considerando el patrón de expresión mostrado por los mapas GEDI (Figura R6) elegimos los clusters más importantes para nuestro estudio. El criterio utilizado fue encontrar aquellos clusters que presentaban mayores diferencias de expresión entre T y TT. La figura R8 muestra los cuatro clusters seleccionados. A partir de entonces estudiamos el perfil que se generó en cada uno de estos clusters para posteriormente elegir los genes que mejor pudieran caracterizar a los T y TT. Como hemos mencionado anteriormente, se puede observar que hay una gran similitud entre los mapas GEDI de los experimentos realizados, con independencia de la línea tumoral empleada (Figura R6, comparar el perfil general entre los distintos experimentos).

Cada uno de los cuatro clusters seleccionados (Figura R8) nos arrojó una lista de aproximadamente mil genes que presentan cambios de expresión en T, TT y en las células tumorales comparado con los MØ. Estos genes están agrupados y graficados en la figura R9 según su función biológica obtenido de la base de datos de Ingenuity (Ingenuity Systems®, www.ingenuity.com ver M & M). Como se puede observar en la figura R8, los clusters presentan un patrón general de expresión (sobre expresión y represión), pero puede abarcar algún gen que salga de este patrón (ver flechas en el cluster III, Figura R8).

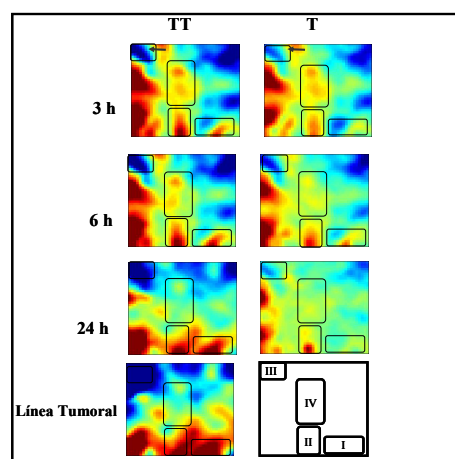


Figura R8. Representación esquemática de los clusters seleccionados para los análisis del perfil de T y TT. Cada cluster tiene una tendencia general (sobre expresión o reexpresión), sin embargo, algunos engloban genes que no siguen el comportamiento mayoritario (ver flechas).

El cluster I engloba genes que aumentan su expresión con el tiempo, y que alcanzan los mayores niveles en el punto experimental TT 24 horas (Figura R8). Según el gráfico circular, correspondiente a este cluster, un 61,3% de los genes están implicados en la generación y/o progresión del cáncer, 15,77% son responsables de la respuesta inmune, 4% de muerte celular y 3,55% de crecimiento celular (Figura R9).

De la misma manera, el gráfico correspondiente al cluster II (Figura R9), presenta la sobre expresión de un 47% de genes responsables de procesos tumorales y como en el cluster I, los TT (24 horas) son el punto de máxima expresión de estos genes (Figura R8). Además, en el cluster II, hay un 19% de genes responsables del funcionamiento del ciclo celular y 1,05% de organización celular.

Por su parte, el cluster III agrupa los genes que tienen su expresión disminuida con el tiempo, y los niveles más bajos también están en el punto TT 24 horas (Figura R8). Los genes más representados son los de las siguientes funciones biológicas: proliferación de leucocitos (8%), diferenciación de macrófagos (0,3%) y de linfocitos B y T (0,89%), respuesta inflamatoria (1,47%), activación de leucocitos (5%), respuesta inmune y marcadores de leucocitos (4%), migración celular (12%), fagocitosis (1,45%), procesamiento antigénico (0,2%), proliferación de leucocitos (8,38%), procesos inmunológicos (1,77%) (Figura R9).

Finalmente, el cluster IV es el que agrupa una sobre expresión, principalmente en el tratamiento T, y que se va igualando a los MØ controles con el tiempo (Figura R8, se pasa del rojo al azul claro). En este cluster, encontramos genes con funciones

biológicas muy diversas, desde los que tienen funciones moleculares, genéticas y epigenéticas hasta los responsables del mantenimiento celular y de procesos cancerígenos. Entre ellos están los de síntesis (1,19%) y procesamiento (9,6%) de ARN, metilación de ADN (3,6%), depleción (1,19%), translocación (1,8%), síntesis de proteínas (10%), maduración de células mieloides (3%), apoptosis (6,58%) y endocitosis (10,17%) o fagocitosis (1,2%). Están también genes responsables de neoplasia (1,19%), mutagénesis (1,8%), mantenimiento y función celular (1,8%) (Figura R9).

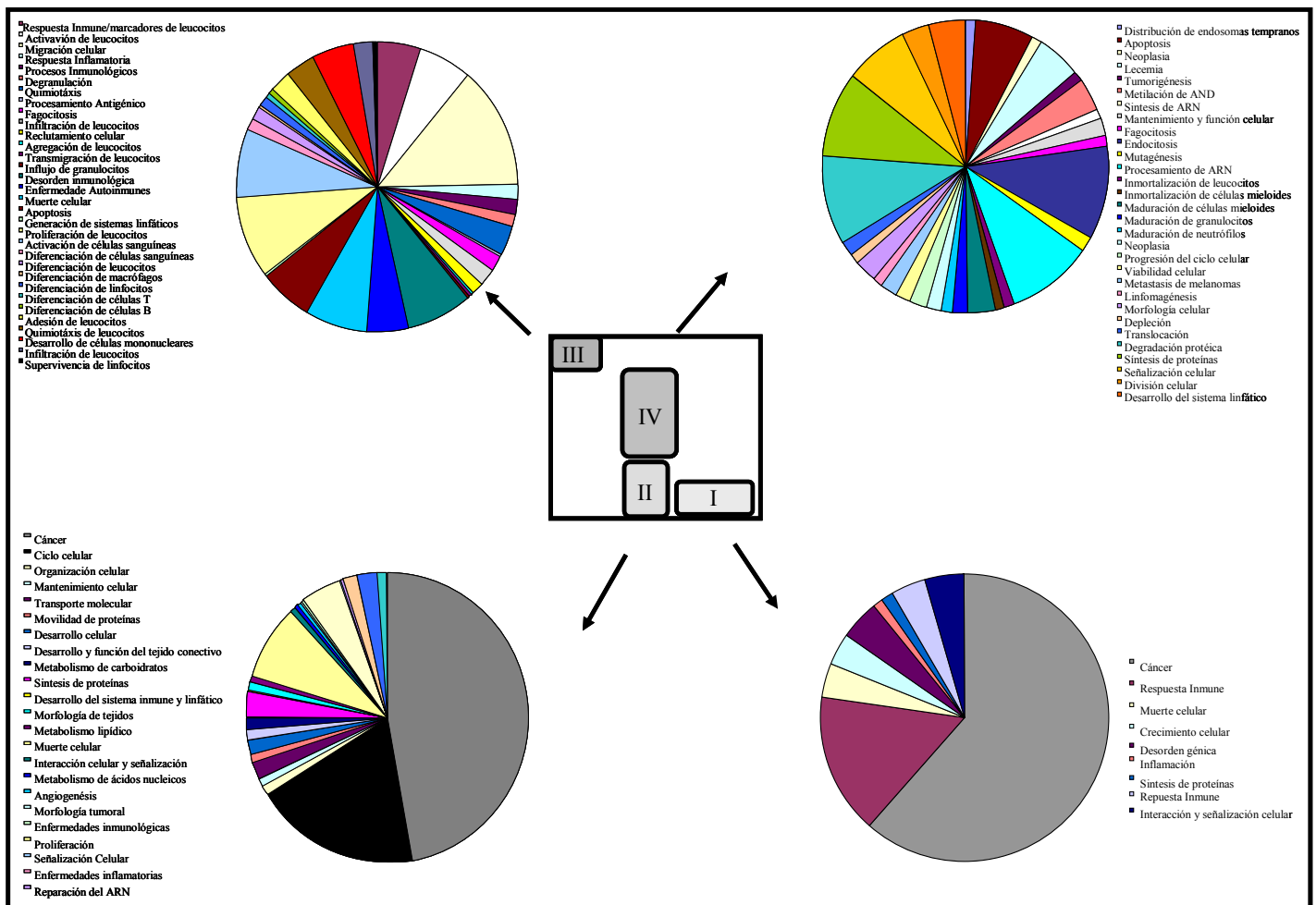


Figura R9. Gráficas circulares de función biológica de cada cluster seleccionado (Figura R8). Datos obtenidos a través del programa Ingenuity Systems® (www.ingenuity.com).

Una de las visiones globales, que nos dan nuestros resultados de microarrays representados en los mapas GEDI y en las gráficas de función biológica de Ingenuity, es que los TT experimentan una reprogramación genética con el tiempo que les asemeja a las células tumorales. Se puede apreciar que los TT presentan aumento de expresión fundamentalmente de genes que tienen como función biológica el desarrollo de procesos cancerígenos. Por otro lado, estas mismas células presentan disminución de expresión de genes que desempeñan actividades inmunológicas típicas de MØ activados (comparar figuras R8 y R9).

Después de obtener esta visión global pasamos a analizar cuáles son los genes presentes en los clusters. Con este objetivo hicimos una selección de genes pertenecientes a cada cluster en base a su función biológica (Tabla R2), según los análisis de las gráficas de la figura R9 y que tuvieran implicación en la respuesta inmune o en el desarrollo tumoral. Prestamos mayor atención aquellos responsables de activar o bloquear la respuesta innata e inflamatoria por ser el objeto de este estudio (Tabla R2, genes destacados).

En este sentido, los genes que están destacados en la Tabla R2 son aquellos que elegimos para comprobar su expresión, ya que es objetivo de este trabajo estudiar los cambios en la respuesta inmune que sufren los MØ enfrentados al tumor. Se puede apreciar que una gran mayoría de genes elegidos pertenecen al cluster III, debido a su implicación en la presentación antigénica y la importancia que tiene este evento en el fenómeno que estamos estudiando. Por otra parte, comprobamos los genes más estudiados en la caracterización MØ enfrentados a tumores.

Cluster	Genes Importantes
I	IL-12, LIF , MIF, MKNK2, MTA1, MTA3, NFKBIL2, NKRF, NOS2, BCL2A1, CCL23, CCL3L3, CCL5, CCR7, CD40, CD44, CD70, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, HLA-A, HLA-C, IL10, IL1A, IL1B, IL1R1, IL2RA, IL2RB, IL7R, IL8, IRAK2, HLA-G, MAP2K3, MAP3K5, MAP3K8, MAP4K4, MAPK13, MAPK6, MICA, MICB, NFKB1, NFKB2 , SOCS1, SOCS3, TNFAIP3, TNF-α , TRAF1, TREM-1 , MMP7
II	ATP1A1, ATP1A3, ATP1A4, ATP1B1, ATP2A2, CD59, CDK3, CDK4, CDK6, CDK7, HSP90AA2, HSP90AB1, HYOU1, LAMA4, METAP2, MT1E, MT2A, PA2G4, PAPSS2, PRCC, PRMT1, PTGES, PTPN11, RARG, RAS, RPL5, RPL23, RPS2, SEC61G, SLC19A2, SMAD3, SMC4, STIP1, STK35, TERT, TES, TPI1, TPT1, TUBA1C, TUBA3C, TUBA4A, TUBB, TUBB3, TUBB2A, TUBB2C, VEGFA, XRCC6, YWHAE, PDGFA, PDGFB, IL-6, IL-10, CCL18
III	CD14, CD163, CD64 , CD68, CD80, CD86 , CDKN1A, CDKN1C, CDKN2B, CIITA , CXCL10, CXCL11, CXCL16, CXCL9, CXCR3, CXCR4, HLA-DM , HLA-DM β , HLA-DO α , HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQβ1 , HLA-DR α , HLA-DRβ1 , HLA-DR β 3, HLA-DR β 4, HLA-DR β 5, IFNAR1, IFNAR2, IFNGR1, IFNGR2, IL10RA, IL10RB, IL1R2, IL1RN, IL2RB, IL2RG, IL3RA, IL6R, IL7, IL-23, IRAK-M , IRF1, IRF2, IRF4, IRF5, IRF7, IRF8, IRF9, JAK1, JAK2, JAK3, LTB, MAPK7, MARCO, MYD88, STAT1, STAT2, STAT5A, TAP1, TLR1, TLR2, TLR4, NFATC1, RELB, TRAF3, TRAF3IP3
IV	CD248, CD63, CD7, IKBKB, IL1F10, IL28A, JAK1, MAP3K7IP2, MMP9, CSF-1, IRAK-1, TGF β , STAT3, CCL2

***Tabla R2.** Genes considerados más importantes en los Clusters I, II, III y IV. Señalamos aquellos que serán objeto de estudio en nuestro trabajo.*

3.3. Análisis transcripcional de los genes regulados en los microarrays: Validación de la técnica por Q-PCR

Comentábamos en el epígrafe anterior que seleccionamos los clusters considerando como criterio las diferencias “visuales” (de los mapas GEDI) entre los T y TT. Seguidamente, agrupamos algunos genes de interés según su función biológica (Figura R9, Tabla R2). De esta forma, estudiamos los genes pertenecientes a cada cluster y seleccionamos algunos para las comprobaciones a nivel de ARNm y proteína.

A partir del presente epígrafe, presentaremos los niveles de expresión de estos genes de interés sin seguir el orden que establecimos en la tabla R2. En cambio, agrupamos los genes según la función que desempeñan en la respuesta inflamatoria de MØ enfrentados a tumores, teniendo este criterio más sentido para nuestro trabajo. Por

lo tanto, primero veremos los genes pro-inflamatorios, luego los antiinflamatorios y terminaremos exponiendo un importante mecanismo de supresión de la respuesta inmunológica observado en los TT. A parte de seleccionar los genes implicados en la respuesta inmunológica a tumores, también comprobamos aquellos utilizados en diversos estudios de caracterización de los TT (20, 69, 74). No obstante, en estos estudios se utilizaron MØ de ratón o de pacientes, sin hacer una comparación entre T y TT. Como nuestro modelo nos permite hacerlo propusimos en el presente estudio realizar una comparación más detallada entre T y TT. Por ello y para validar los microarrays comprobamos la expresión de genes por Q-PCR a tiempo real. Posteriormente se analizaron los genes de mayor interés a nivel proteico. Cabe destacar que los datos obtenidos del análisis de microarrays son inabarcables en un solo trabajo y será objetivo de futuros estudios.

El primer grupo de genes analizados fue el de los activadores de la respuesta inflamatoria, algunos de los cuales son expresados por los MØ activados clásicamente (M1 o T) (22). En la figura R10 se puede apreciar que en todos los experimentos, los T presentan inducción de la expresión de TNF α (cluster I) en comparación con los TT o con los MØ controles. En la mayoría de los casos, el punto de máxima expresión de esta molécula inflamatoria es a las 6 horas (excepto en el caso del experimento con SKBR3 que es a las 3 horas). El estímulo TT también puede producir sobre expresión de TNF α en comparación con los MØ, pero casi siempre producen menos TNF α que los T.

La figura R11 muestra la expresión de IL-12p40 (Cluster I), una citocina activadora de la respuesta adaptativa e inductora de la respuesta inflamatoria, que suele ser producida por los M1 (20). Como se puede apreciar en todos los casos, el segundo contacto con la célula tumoral hace que los TT bajen su expresión de IL-12p40 comparado con los T. Otra citocina proinflamatoria que comprobamos fue IL-23p19 (Cluster III), la cual presenta una expresión similar a IL-12p40 (Figura R12); los TT tienen baja la expresión de esta citocina inflamatoria, comparado con los T, excepto en el caso del experimento con la línea celular BXPC3 en TT (24 horas). Así, la visión general es que los TT presentan una disminución en la expresión tanto de IL-12p40 como IL-23p19 comparado con los T (Figura R11 y R12).

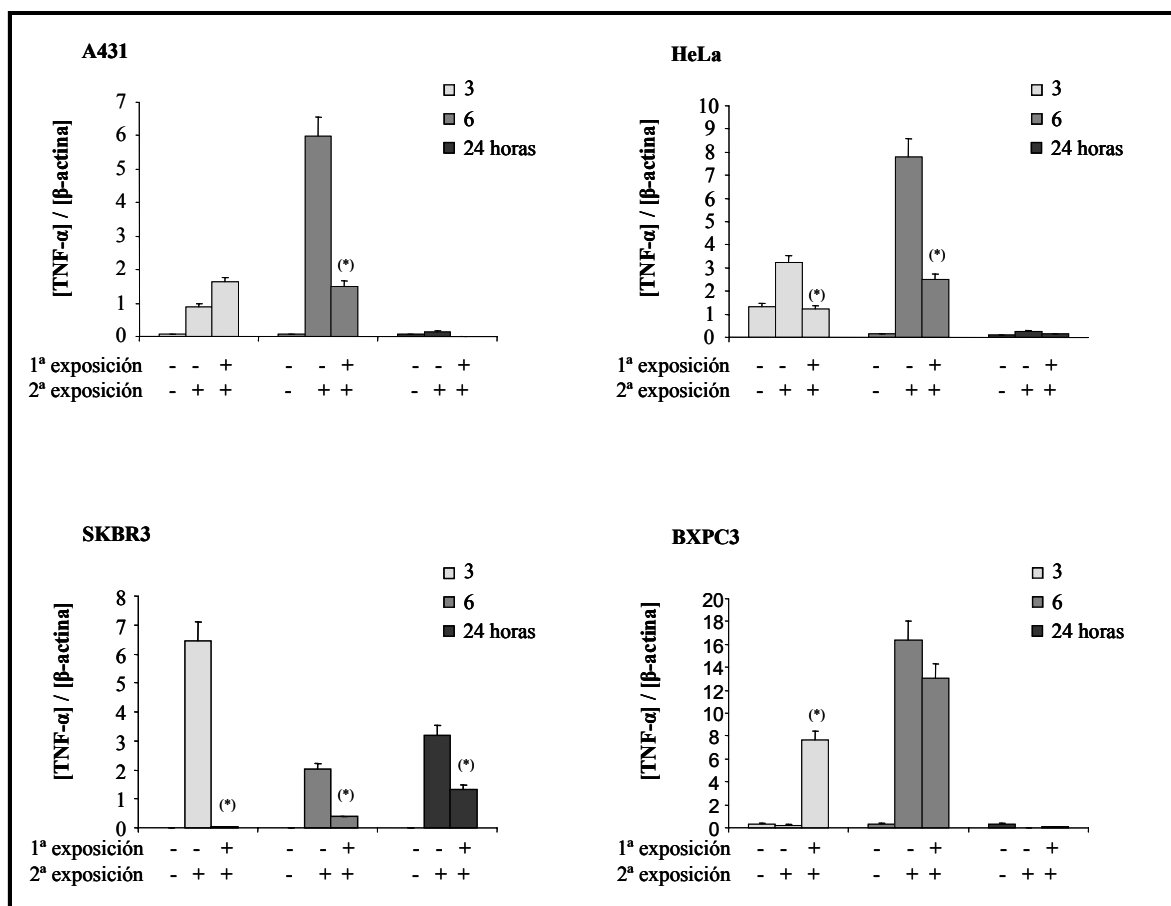


Figura R10. Expresión de TNF α a nivel transcripcional

MØ humanos se sometieron a las condiciones experimentales T y TT. Después, se aislaron las células CD14⁺, se les aisló el ARN total y se sintetizó ADNc. Por Q-PCR valoramos la expresión de TNF α y β -actina en función del tiempo. Analizamos la relación gen / β -actina. MØ controles (1ªs barras), T (2ªs barras) y TT (3ªs barras). Cada gráfica corresponde al experimento hecho con una línea tumoral, según lo indicado en la figura (n=3). (*) $p < 0,05$ de TT con respecto a T.

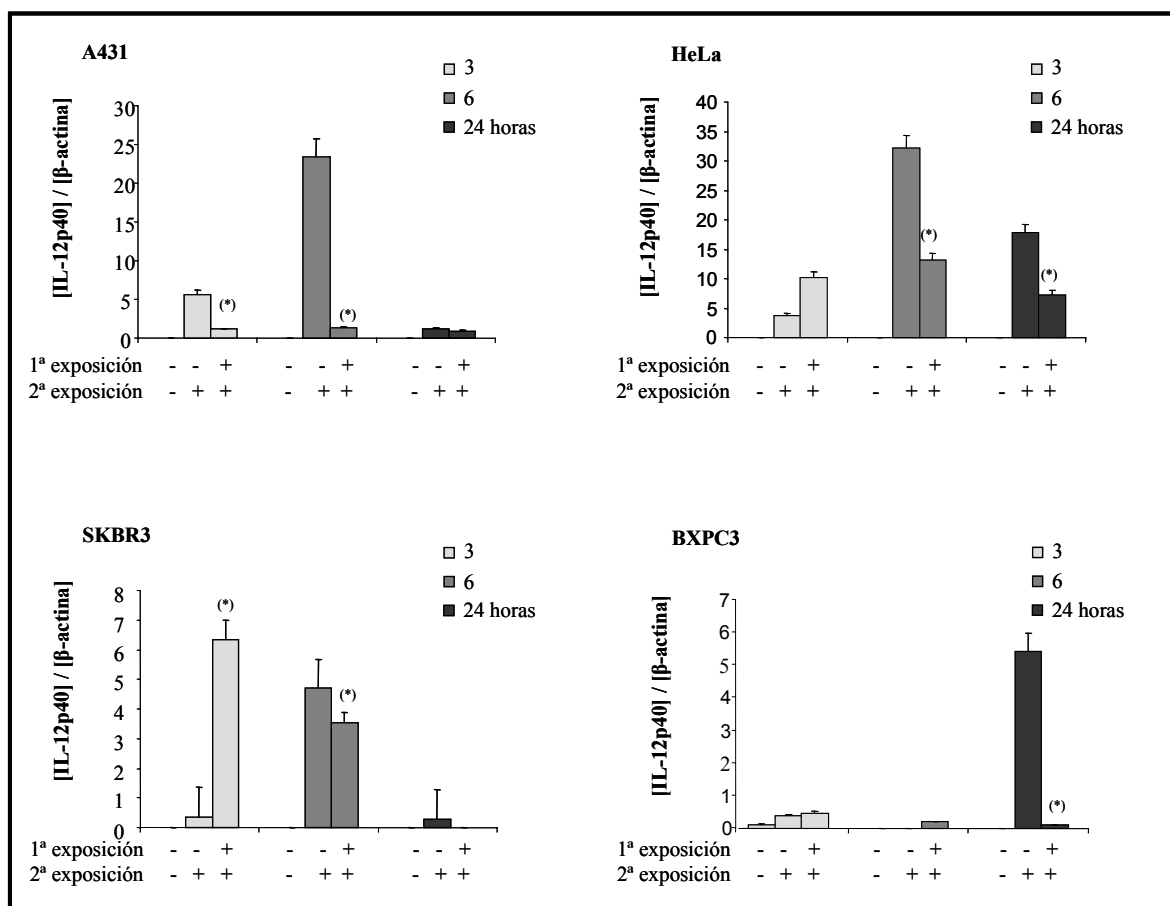


Figura R11. Expresión de IL-12p40 a nivel transcripcional

MØ humanos se sometieron a las condiciones experimentales T y TT. Después, se aislaron las células CD14+, se les aisló el ARN total y se sintetizó ADNc. Así, por Q-PCR valoramos la expresión de IL-12p40 y β -actina en función del tiempo. Analizamos la relación gen / β -actina. MØ controles (1ª barras), T (2ª barras) y TT (3ª barras). Cada gráfica corresponde al experimento hecho con una línea tumoral, según lo indicado en la figura (n=3). (*) $p < 0,05$ de TT con respecto a T.

En el caso de la citocina pro-inflamatoria IL-6 (Cluster II), tanto los T como los TT sobre expresión dicha citocina (Figura R13). A pesar de parecer contradictorio, este fenómeno ya había sido publicado en algunos estudios con TT humanos que confirman que esta citocina, a pesar de ser conocida por su actividad pro-inflamatoria, puede colaborar con la progresión tumoral (69, 74). A tenor de este resultado, decidimos estudiar la citocina LIF (del inglés Leukemia Inhibitory Factor) que es inmunomoduladora y comparte el receptor con IL-6 (82). LIF que nos aparece en el cluster I, presenta expresiones más altas en los TT, aunque sus niveles son altos en

también en T (Figura R14). En un estudio anterior se describió que LIF soluble, presente en el microambiente tumoral, puede ser uno de los responsables de la manifestación del perfil inmunosupresor de los MØ una vez infiltrados en el tumor (69). Nuestros resultados muestran que esta molécula presenta sobre expresión en T y TT desde los puntos experimentales más tempranos y puede significar que LIF induce en los T el perfil inmunosupresor con el tiempo.

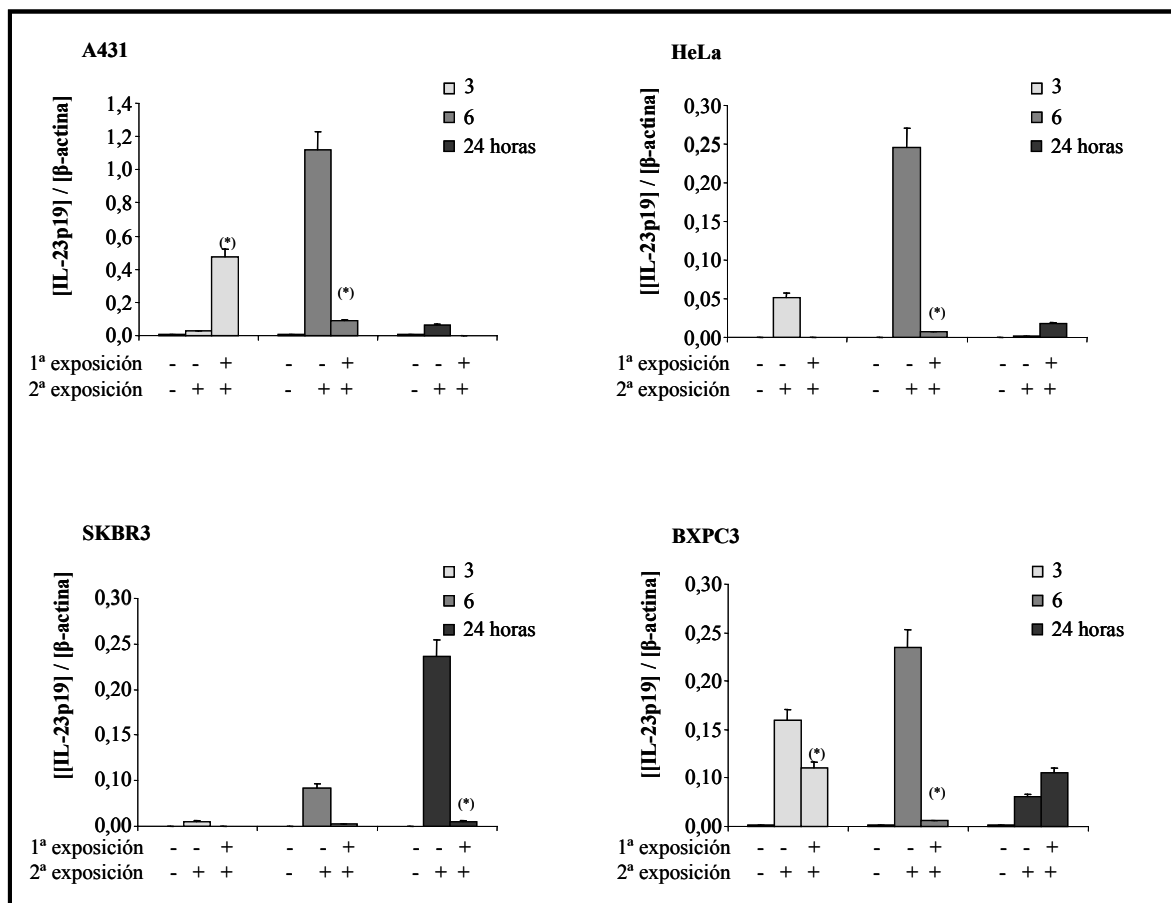


Figura R12. Expresión de IL-23p19 a nivel transcripcional

MØ humanos se sometieron a las condiciones experimentales T y TT. Después, se aislaron las células CD14⁺, se les aisló el ARN total y se sintetizó ADNc. Así, por Q-PCR valoramos la expresión de IL-23p19 y β-actina en función del tiempo. Analizamos la relación gen / β-actina. MØ controles (1ª barras), T (2ª barras) y TT (3ª barras). Cada gráfica corresponde al experimento hecho con una línea tumoral, según lo indicado en la figura (n=3). (*) p<0,05 de TT con respecto a T.

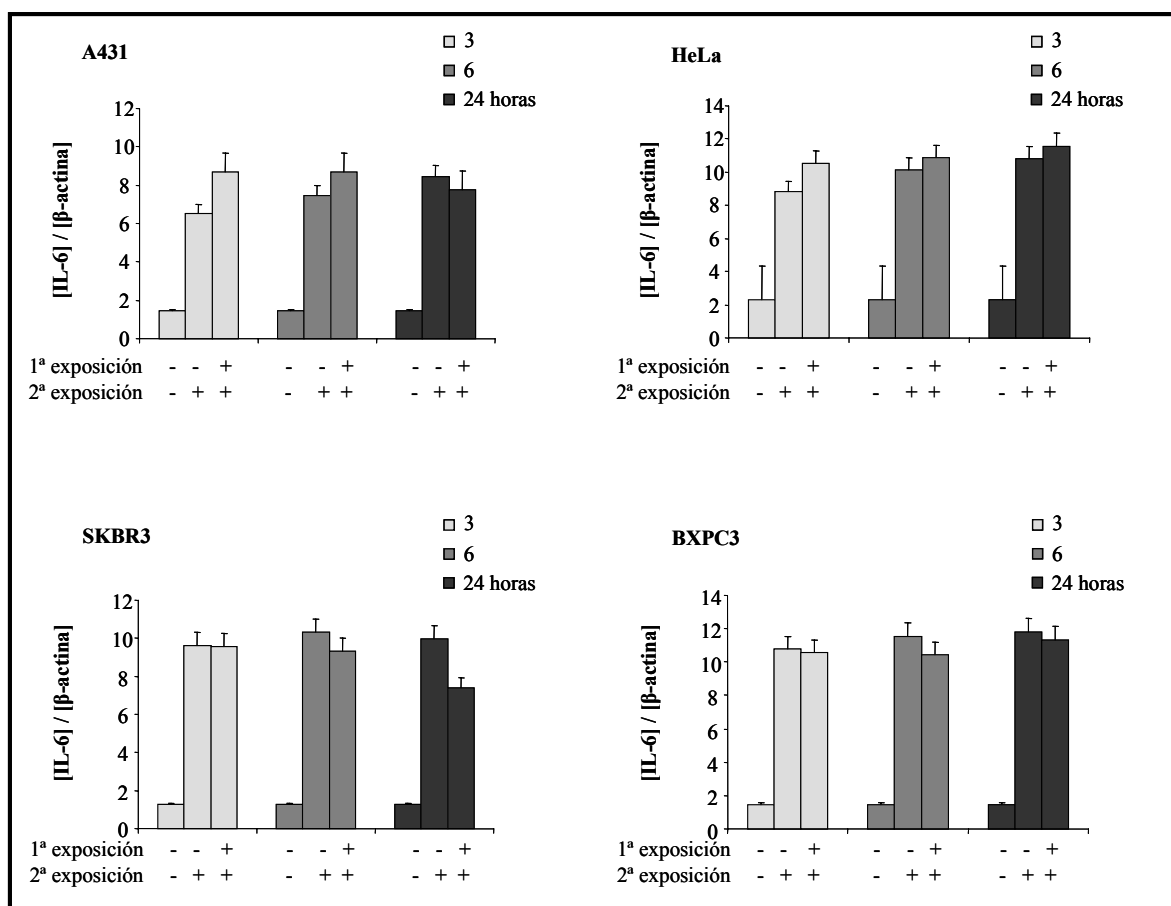


Figura R13. Expresión de IL-6 a nivel transcripcional

MØ humanos se sometieron a las condiciones experimentales T y TT. Después, se aislaron las células CD14⁺, se les aisló el ARN total y se sintetizó ADNc. Así, por Q-PCR valoramos la expresión de IL-6 y β -actina en función del tiempo. Analizamos la relación gen / β -actina. *MØ* controles (1ª barras), T (2ª barras) y TT (3ª barras). Cada gráfica corresponde al experimento hecho con una línea tumoral, según lo indicado en la figura (n=3).

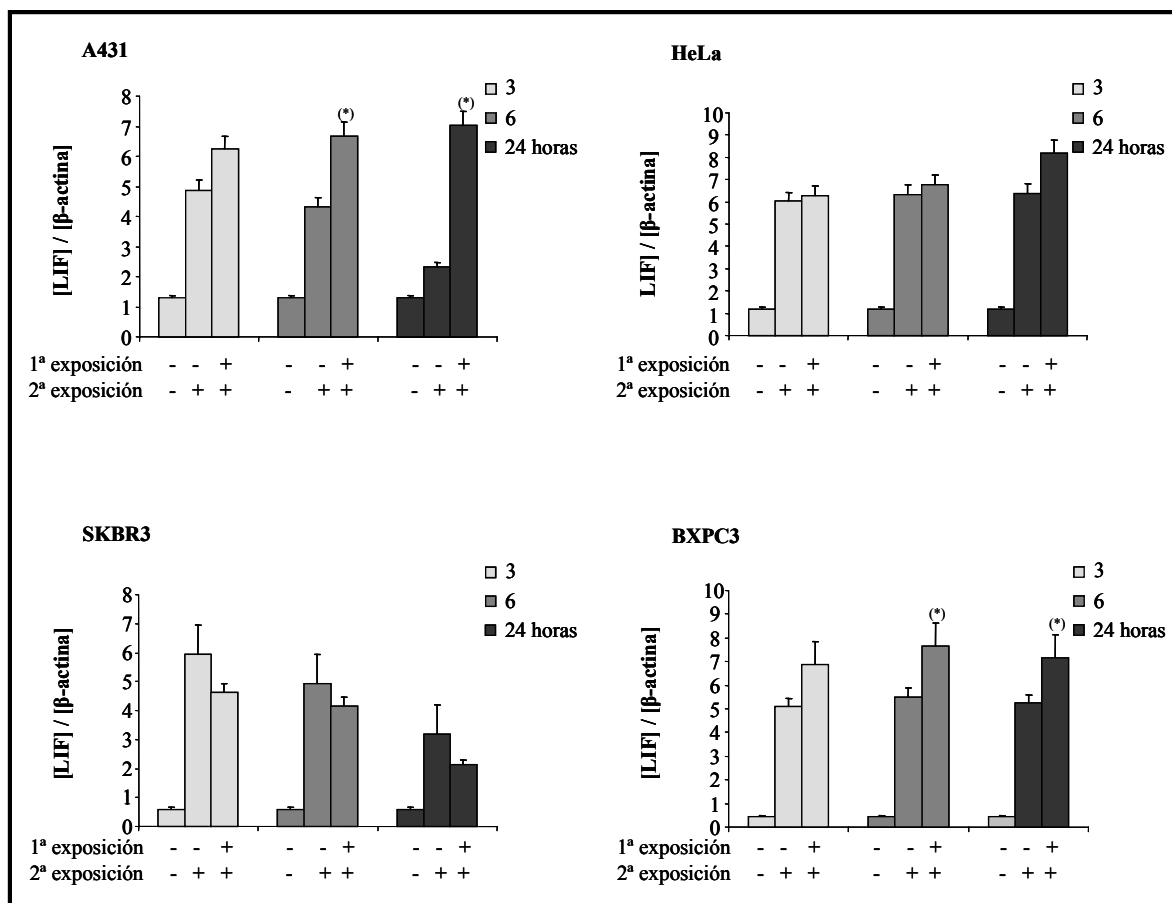


Figura R14. Expresión de LIF a nivel transcripcional

MØ humanos fueron sometidos a las condiciones experimentales T y TT. Después, se aislaron las células CD14+, se les aisló el ARN total y se sintetizó ADNc. Así, por Q-PCR valoramos la expresión de LIF y β -actina en función del tiempo. Analizamos la relación gen / β -actina. MØ controles (1ª barras), T (2ª barras) y TT (3ª barras). Cada gráfica corresponde al experimento hecho con una línea tumoral, según lo indicado en la figura (n=3). (*) $p < 0,05$ de TT con respecto a T.

Una vez obtenidas las expresiones de las citocinas pro-inflamatorias en T y TT procedimos a los análisis de expresión de algunas moléculas anti inflamatorias. En la figura R15 se pueden apreciar los niveles de expresión de la citocina antiinflamatoria IL-10 (Cluster II). Nuestros datos muestran que, con independencia de la línea tumoral, los TT tienen una sobre expresión de IL-10, la cual alcanza sus niveles más altos a las 24 horas del segundo co-cultivo (7 veces más en TT que en los T). En este caso, nuestros datos corroboran las publicaciones que caracterizan a los TT como productores de IL-10 (20, 81), reforzando la hipótesis de que debe ser una de las razones por la que pierden su capacidad antitumoral. La IL-10 es una de las citocinas que más caracterizan

a los TT, existen trabajos que demuestran que, a parte de sus propiedades antiinflamatorias, dificulta la activación de la respuesta adaptativa y promueve la angiogénesis (20).

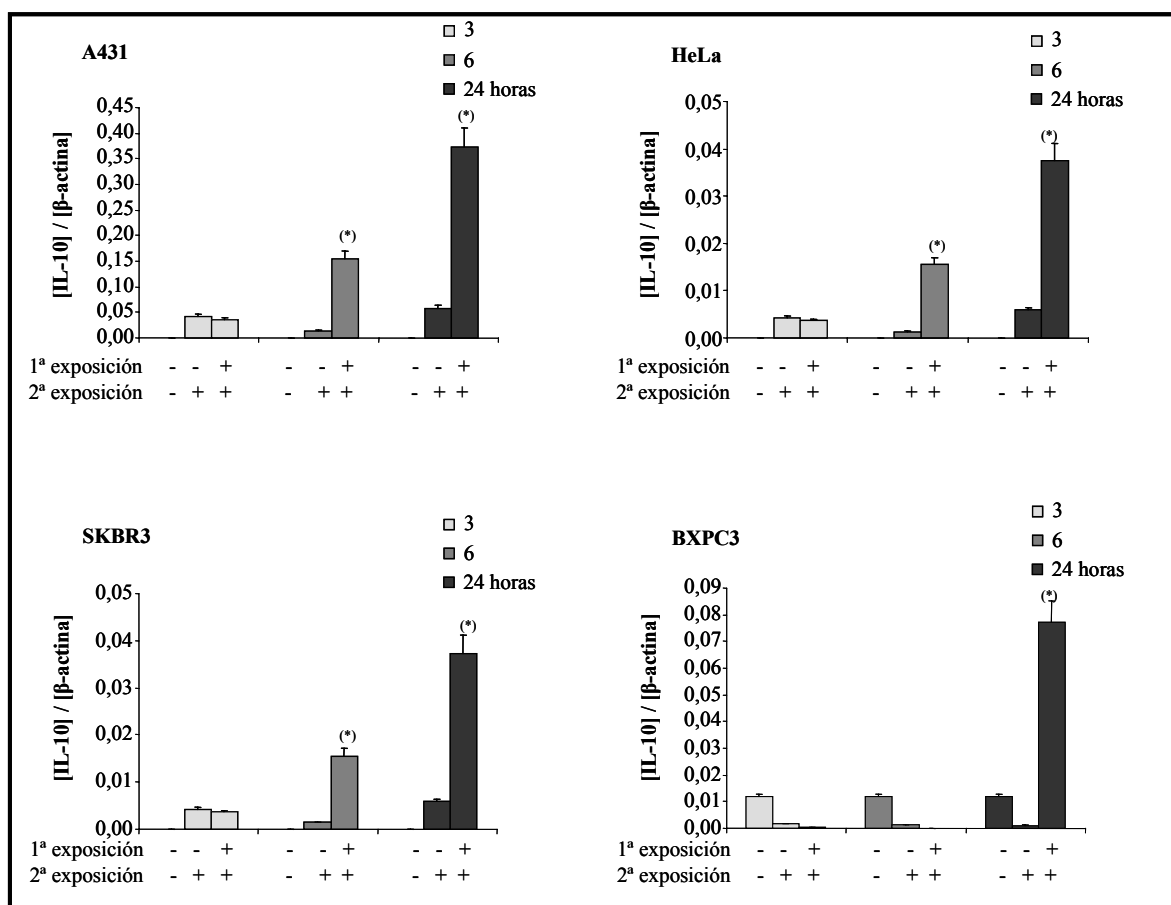


Figura R15. Expresión de IL-10 a nivel transcripcional.

MØ humanos fueron sometidos a las condiciones experimentales T y TT. Después, se aislaron las células CD14+, se les aisló el ARN total y se sintetizó ADNc. Así, por Q-PCR valoramos la expresión de IL-10 y β -actina en función del tiempo. Analizamos la relación gen / β -actina. MØ controles (1ª barras), T (2ª barras) y TT (3ª barras). Cada gráfica corresponde al experimento hecho con una línea tumoral, según lo indicado en la figura (n=3). (*) $p < 0,05$ de TT con respecto a T.

En esta dirección, otra de las moléculas supresoras de la respuesta inflamatoria aquí analizada fue IRAK-M (Cluster III). Esta pseudoquinasa es bien conocida por su capacidad de regular negativamente una de las cascadas de señalización que lleva a la inducción de la respuesta inflamatoria (43, 47, 54). Pudimos confirmar a través de nuestros experimentos que hay una sobre expresión de esta molécula tanto en T, como en TT. Sin embargo, los TT sufren una bajada en los puntos experimentales más tempranos (Figura R16). Esta bajada en realidad es fruto de un adelanto en su expresión tal y como se comprobó en un estudio previo (19). En todos los casos, la expresión de esta pseudoquinasa fue significativa en TT a 1 hora para luego caer a las 3 horas (datos no mostrados), lo cual indica que su expresión muy temprana en TT refuerza el perfil anti inflamatorio de estos MØ. De acuerdo con estos resultados, en un estudio recientemente publicado, se demostró que ratones “knock-out” para IRAK-M no desarrollan tumores después de la inyección de células tumorales (75).

Nuestros datos muestran que, en concordancia con lo mostrado en nuestro estudio previo (19), los TT obtenidos expresan IRAK-M a la vez que pierden la inducción de TNF α , propiciada por el primer encuentro con la célula tumoral (comparar figuras R11 y R16).

En el cluster I destaca la expresión TREM-1 (del inglés Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells) por la importancia dada en estudios anteriores relacionados con la respuesta inflamatoria (45, 83) TREM-1 es un receptor de membrana capaz de amplificar la respuesta inflamatoria de MØ y neutrófilos (45, 83). La gráfica de la figura R17 muestra que TREM-1 está sobre expresada en T y en TT, de acuerdo con un estudio previo que analiza esta molécula en pacientes con cáncer de pulmón (84).

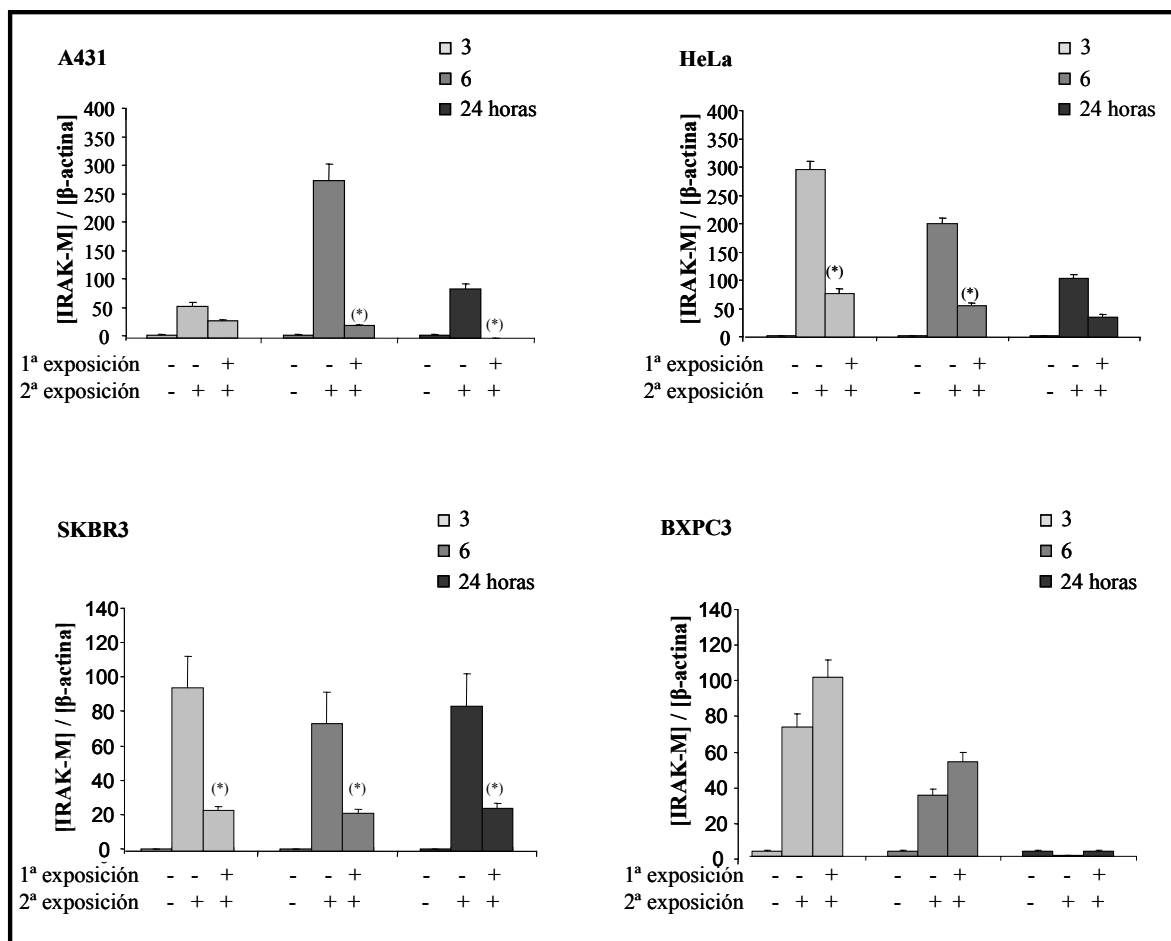


Figura R16. Expresión de IRK-M a nivel transcripcional

MØ humanos se sometieron a las condiciones experimentales T y TT. Después, se aislaron las células CD14+, se les aisló el ARN total y se sintetizó ADNc. Así, por Q-PCR valoramos la expresión de IRK-M y β -actina en función del tiempo. Analizamos la relación gen / β -actina. *MØ* controles (1ª barras), T (2ª barras) y TT (3ª barras). Cada gráfica corresponde al experimento hecho con una línea tumoral, según lo indicado en la figura ($n=3$). (*) $p < 0,05$ de TT con respecto a T.

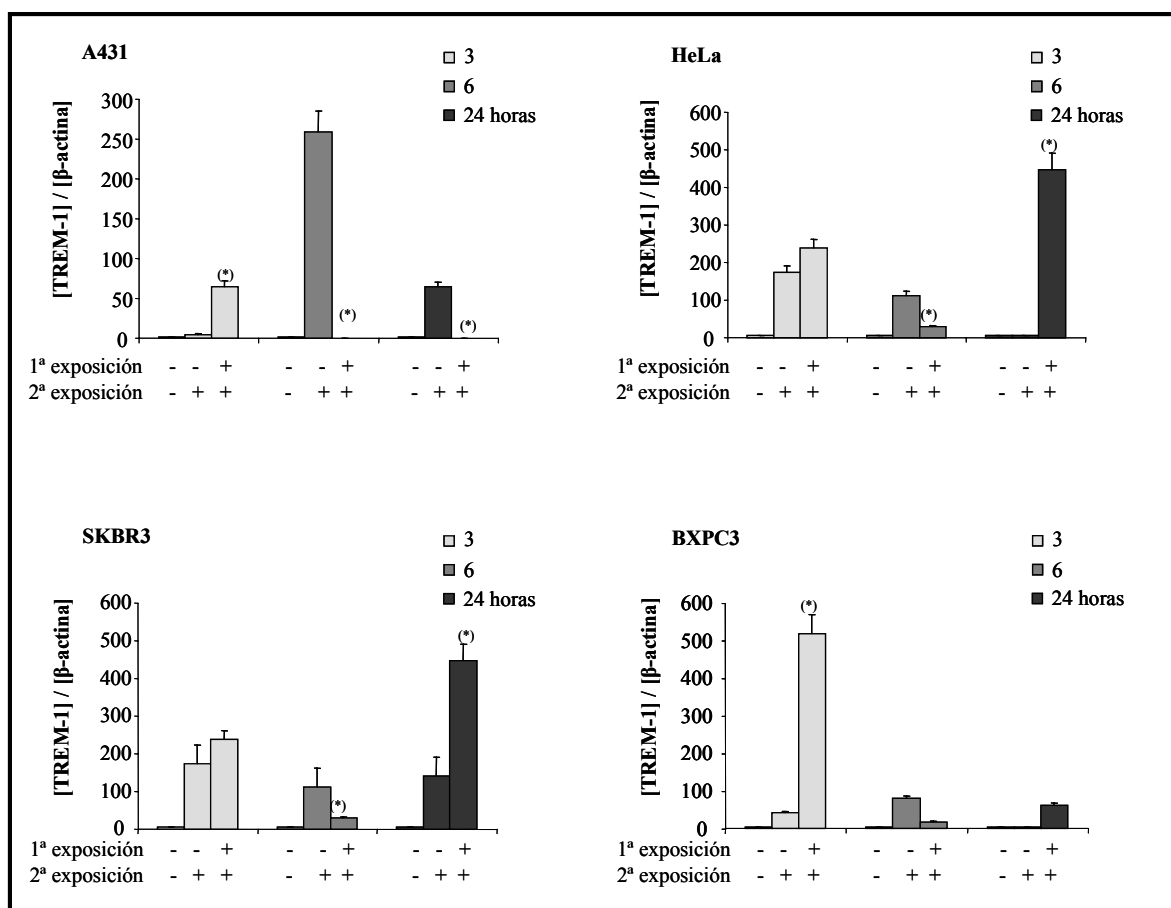


Figura R17. Expresión de TREM-1 a nivel transcripcional por los MØ controles, T y TT.

MØ humanos se sometieron a las condiciones experimentales T y TT. Después, se aislaron las células CD14+, se les aisló el ARN total y se sintetizó ADNc. Así, por Q-PCR valoramos la expresión de TREM-1 y β -actina en función del tiempo. Analizamos la relación gen / β -actina. MØ controles (1ª barras), T (2ª barras) y TT (3ª barras). Cada gráfica corresponde al experimento hecho con una línea tumoral, según lo indicado en la figura (n=3). (*) $p < 0,05$ de TT con respecto a T.

Finalmente, y para cerrar el capítulo de las comprobaciones por Q-PCR de los resultados arrojados por el microarrays, analizamos la expresión de NF- κ B2/p100 (Cluster I). Cabe destacar que esta molécula no ha sido relacionada de manera directa con el fenómeno que aquí analizamos, la mayoría de los estudios se enfocan en la expresión y regulación de NF- κ B1 en este contexto (85). Este elemento de la ruta de señalización de NF- κ B es crucial para la regulación de la cascada no canónica de activación de la ruta pudiendo ser responsable de una activación alternativa de MØ enfrentados a patógenos (86, 87).

Nuestras comprobaciones de NF- κ B2/p100 a nivel de ARNm mostraron que los TT presentan un aumento en su expresión en los puntos más tempranos en comparación con los T. Sin embargo, los T comienza a expresarlo de manera más tardía (Figura R18). Esto indica una activación temprana de la vía alternativa en los TT que refuerza la hipótesis de la reprogramación hacia un fenotipo más antiinflamatorio en los macrófagos infiltrados.

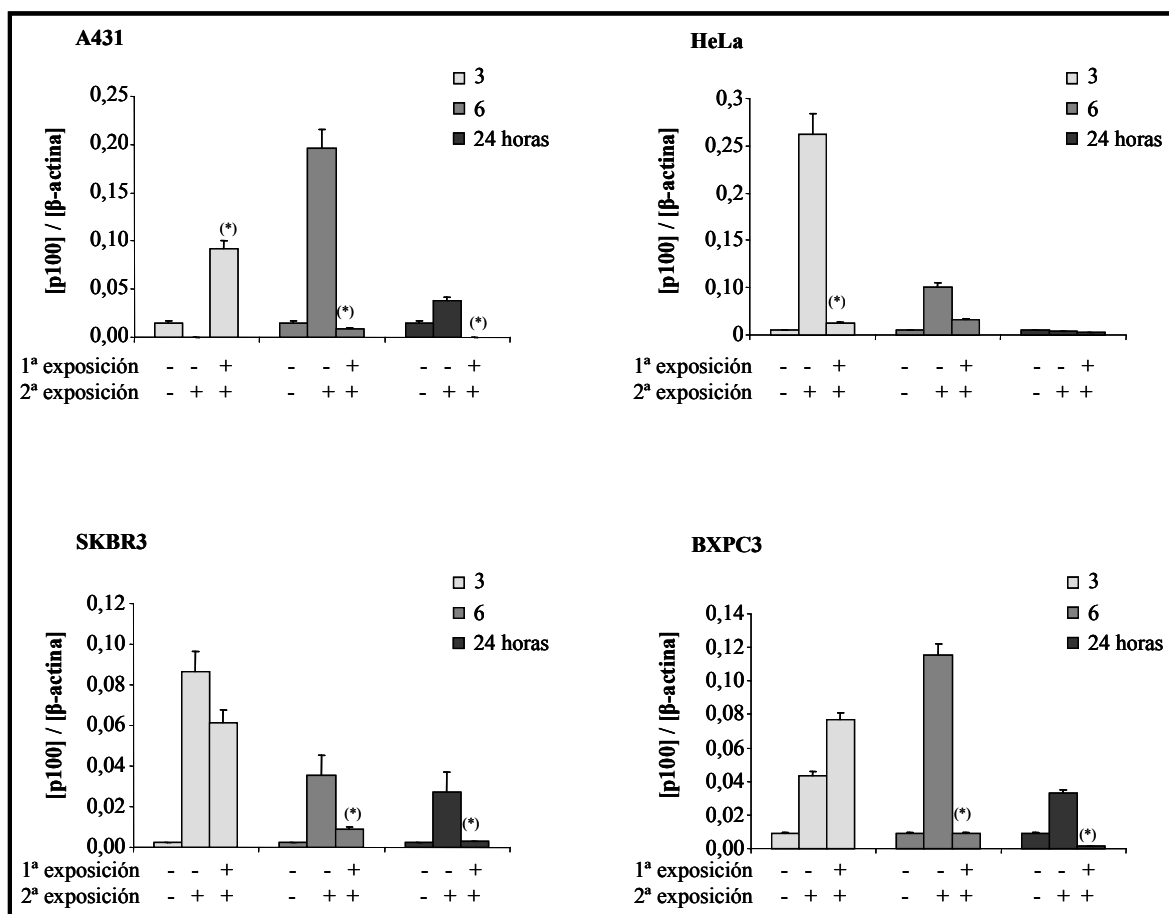


Figura R18. Expresión de NF- κ B2/p100 a nivel transcripcional

MØ humanos se sometieron a las condiciones experimentales T y TT. Después, se aislaron las células CD14+, se les aisló el ARN total y se sintetizó ADNc. Así, por Q-PCR valoramos la expresión de NF- κ B2/p100 y β -actina en función del tiempo. Analizamos la relación gen / β -actina. MØ controles (1ª barras), T (2ª barras) y TT (3ª barras). Cada gráfica corresponde al experimento hecho con una línea tumoral, según lo indicado en la figura (n=3). () $p < 0,05$ de TT con respecto a T.*

El conjunto de estos resultados validan, en parte, lo observado en los análisis de microarrays. De esta manera, los TT presentan un perfil de alta expresión de IL10/ IL-

6/ LIF y baja expresión IL-12/ IL-23 /TNF α otorgando a estas células un perfil más próximo a lo que se ha descrito para los TIMs que a los M1 (81). Por otra parte, la expresión de IRAK-M y NFkB2/p100 nos habla de una reprogramación de estas células.

3.4. Validación de expresión proteica de datos obtenidos en los microarrays

Llegados a este punto decidimos comprobar la expresión proteica de algunas moléculas que consideramos importantes, por su presencia en los microarrays y/o por la cinética presentada en las comprobaciones a nivel de ARNm. Entre ellas están la molécula coestimuladora CD86 (Cluster III) y el receptor “secuestrador” CD163 (Cluster III), ambos descritos en un estudio anterior que caracterizaba a TIM de cáncer de ovario (69). También el receptor amplificador de la respuesta inflamatoria TREM-1, la citocina TNF α y la pseudoquinasa IRAK-M, estas últimas por su importancia en la definición del perfil de los T como pro-inflamatorios y los TT como antiinflamatorios. Todas estas moléculas nos ayudaron a definir el perfil inmunosupresor de los TT y a encontrar un importante mecanismo de “freno” de la activación de la respuesta inmune innata en estas células.

Como hemos demostrado anteriormente, nuestros resultados de microarrays demuestran que el perfil general de los T y TT es independiente de la línea tumoral utilizada en los co-cultivos (Figura R6). Por ello, en los siguientes análisis decidimos utilizar solamente dos de las líneas tumorales usadas: A431 y HeLa. Su elección se basa en que por una parte, A431 ha sido la línea donde se obtuvieron los resultados que dan pie a este trabajo y, por otra parte, la línea celular HeLa es ampliamente conocida y utilizada en diversos estudios como modelo tumoral (88, 89).

Debido a que nuestra intención era detectar con claridad la expresión a nivel proteico, aumentamos el tiempo de estímulo a 48 horas en algunos de los experimentos. Si empezamos por la “superficie celular”, la primera molécula que analizamos fue CD163 (69), por ser considerado un marcador de MØ, luego procedimos a estudiar la proteína coestimuladora CD86 (69) y finalmente TREM-1 por su función inflamatoria (84).

CD163 es un receptor secuestrador (traducción del inglés “scavenger receptor”) caracterizado por su alta expresión en TIMs de cáncer de ovario (69) e inducible por IL-10 (90). Nuestros microarrays desvelan que CD163 está sobre expresado en TT y un

análisis de su expresión por citometría de flujo muestra que los T y TT sobre expresan CD163. Sin embargo,, los TT presentan un 40% más de células CD163+ que los T a las 48 horas (Figura R19, panel superior).

En el caso de CD86, una molécula coestimuladora que en otros estudios ha resultado estar reprimida en TIMS de cáncer de ovario (69), presenta una significativa disminución de su expresión en los TT (un 20% a las 24 horas y un 40% a las 48 horas de estímulo, Figura R19, panel central). Nuestros datos muestran por vez primera la comparación en la expresión de CD86 entre T y TT, a parte de que refuerzan el uso de esta molécula como marcador de los TT.

Finalmente analizamos la expresión de TREM-1, que como mencionamos anteriormente, es un receptor que amplifica la respuesta inflamatoria (84). La cinética de expresión de TREM-1 en los T es de aumento a las 6 y 24 horas, y luego una leve caída a las 48 horas. En cambio los TT presentan niveles de expresión más altos que los T, llegando a tener una diferencia del 70% a las 48 horas (Figura R19, panel inferior). Estos resultados son aparentemente contradictorios ya que los TT poseen un perfil antiinflamatorio. Sin embargo, debemos tener en cuenta el mecanismo de actuación de TREM-1. Este receptor puede sufrir un corte proteolítico, mediado por metalloproteasas, y de esta manera generar una forma soluble de TREM-1 (sTREM-1) quien tiene una marcada actividad antiinflamatoria (84). Más adelante comprobamos la expresión de sTREM-1 soluble y se comenta su posible implicación en nuestro estudio.

Cabe destacar que, debido a su importancia en la activación de la cascada inflamatoria en la que están implicadas las IRAKs y el factor de transcripción NF-kB (56), realizamos ensayos de citometría de flujo para detectar TLR4. Como era esperado los T y TT no presentan diferencia en la expresión de TLR4 si se compara con los MØ (datos no mostrados). Se ha publicado que la sobre expresión de TLR4 por células tumorales puede ser considerado un mecanismo de “escape” del sistema inmune (42), sin embargo, en nuestros experimentos no hubo diferencia significativa en la expresión de esta molécula por las células tumorales (datos no mostrados).

De esta manera, los resultados de las comprobaciones a nivel proteico nos demuestran que los TT sobre expresan CD163 y TREM-1 y que los altos niveles de CD86 se van disminuyendo con el tiempo en estas células. Los datos corroboran los resultados de los microarrays y nos ayudan a definir el perfil inmunosupresor de los TT.

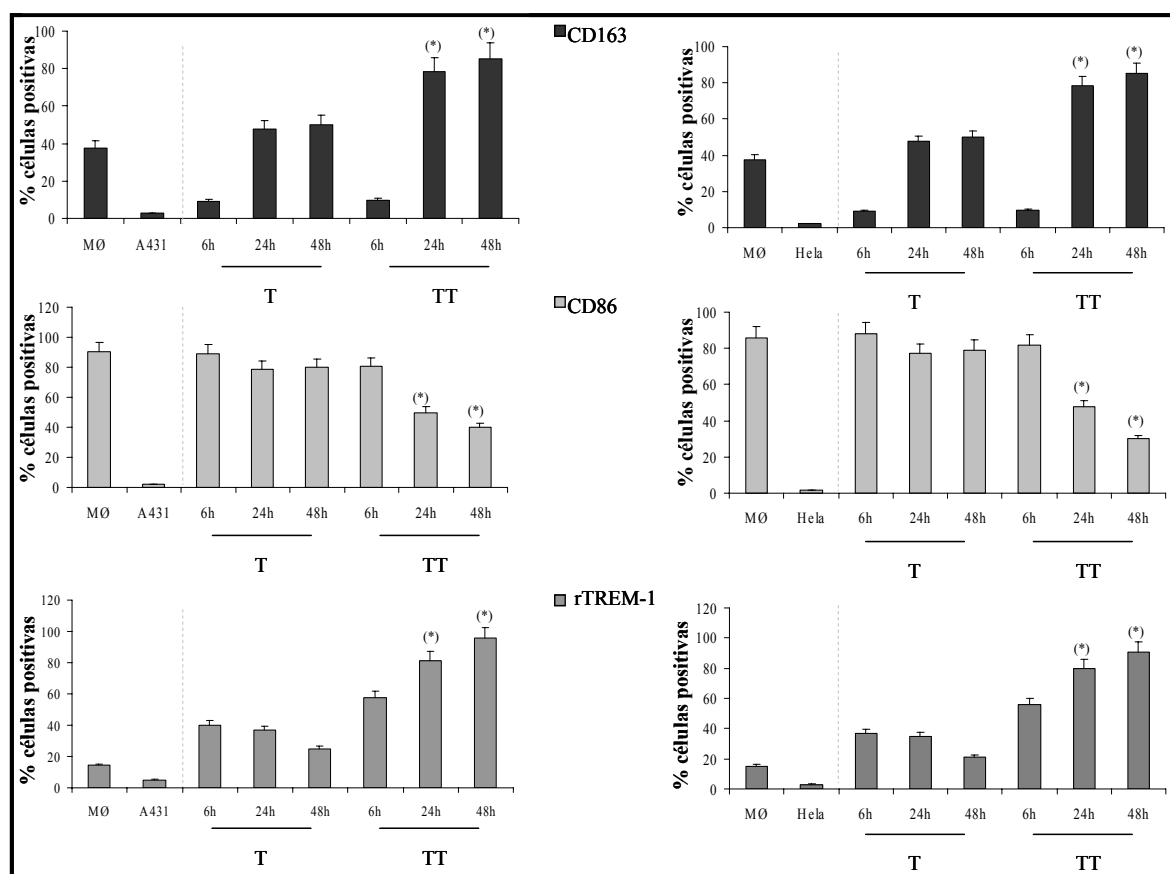


Figura R19. Validación de los resultados de microarrays a nivel de traduccional.

MØ controles, T y TT (6h, 24h y 48 h), y las células tumorales A431 y HeLas se marcaron con anticuerpos específicos para proteínas de superficie como se describe en Material y Métodos, y se analizaron por citometría de flujo. Las proteínas valoradas fueron CD163 (panel superior), CD86 (panel central), TREM-1(panel inferior), como indica la figura. Los resultados se analizaron según el porcentaje de células positivas para las proteínas marcadas, comparado con el control isotipo. $n=3$. (*) $p<0,05$ de TT con respecto a T.

Seguidamente procedimos a analizar la expresión proteica de IRAK-M, TNF- α y sTREM-1 por Western Blot. En la figura R20A, se puede apreciar se confirman los resultados obtenidos a nivel transcripcional de expresión de IRAK-M y TNF- α . Los TT sobre expresan IRAK-M y disminuyen la expresión de TNF α en comparación con los T. Estos resultados corroboran nuestros datos publicados anteriormente (19).

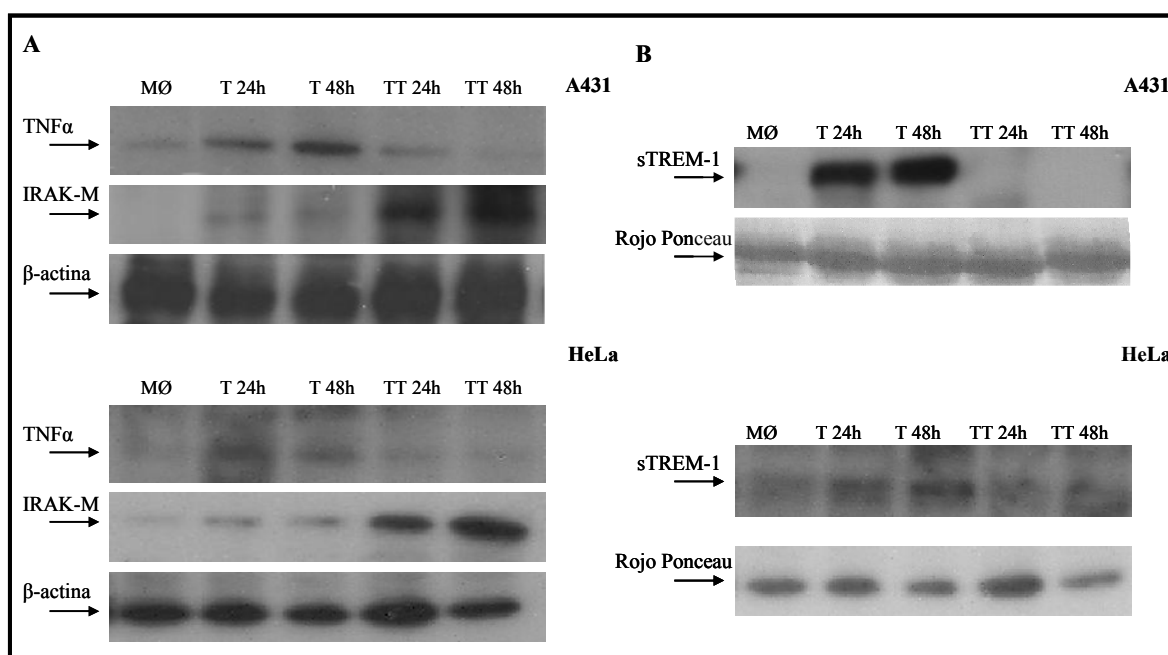


Figura R20. Validación de los resultados de microarrays en nivel de expresión protéica.

Western Blot representativo de los experimentos hechos con células A431 y HeLa. MØ humanos se sometieron a las condiciones experimentales T y TT y luego fueron aisladas las células CD14⁺. Seguidamente se les aislaron las proteínas totales y se realizaron ensayos de Western Blot utilizando anticuerpos específicos contra TNF α , IRAK-M y β -actina (A). Para sTREM-1 se utilizó el sobrenadante de los co-cultivos de las condiciones experimentales T, TT (24h y 48 h) o de los MØ controles (B). El control de carga de proteínas para el Western Blot de TREM-1 soluble se hizo con la tinción de la membrana con Rojo Ponceau (n=3).

En la misma figura R20 (panel B) se muestran los niveles de expresión de TREM-1 soluble (sTREM-1). Como se puede apreciar, esta molécula aparece expresada en su forma soluble por los T y no por los TT. Es sabido que TREM-1 puede sufrir un corte por MMPs cuando está sobre expresada en superficie, resultando en la expresión de su forma soluble (45). Así, nuestros resultados de citometría de flujo nos mostraron que los T y los TT presentan inducción de TREM-1 en superficie. No obstante, los T van perdiendo esta expresión con el tiempo, mientras que los TT sufren un aumento de la misma (Figura R19). De esta manera, como se puede apreciar en los resultados de Western Blot, se detectó TREM-1 soluble solamente en los T indicando que en los TT,

TREM-1 puede no haber sufrido el corte por MMPs y por ello no lo detectamos en su forma soluble (Figura R20B).

Una vez comprobada la expresión a nivel proteico de los genes de interés para la caracterización del perfil de los T y TT, procedimos a estudiar otros genes importantes para el presente estudio. Analizando los resultados de los microarrays detectamos que algunos genes implicados en la presentación antigénica, como los HLA de clase II (Cluster III) (28) y en la fagocitosis, como el CD64 (Cluster III) (91) presentaron un perfil diferencial de expresión entre T y TT. Estos factores son centro de nuestro estudio en los siguientes capítulos.

3.5. Expresión de CD64 y fagocitosis en TT

Como se puede apreciar en el cluster III, los T y TT presentan expresión diferencial de la molécula CD64 (Tabla R2). Como el receptor de superficie CD64, es conocido por ser un marcador de fagocitosis (91) comprobamos si los TT lo expresan en mayores niveles en comparación con los T, algo que se se había sugerido en un estudio utilizando TIMs de pacientes con melanoma metastático (92). La importancia del posible aumento en la expresión de CD64 por los TT nos llevó a hipotetizar si estas células podrían tener la capacidad de fagocitosis incrementada.

La expresión de CD64, analizada por citometría de flujo, se muestra en la figura R21. Los histogramas muestran que los TT presentan un incremento en la expresión de CD64 en comparación con los T que se evidencia a las 24 horas (5 veces para A431 y 4 veces para HeLa, ver figura R22).

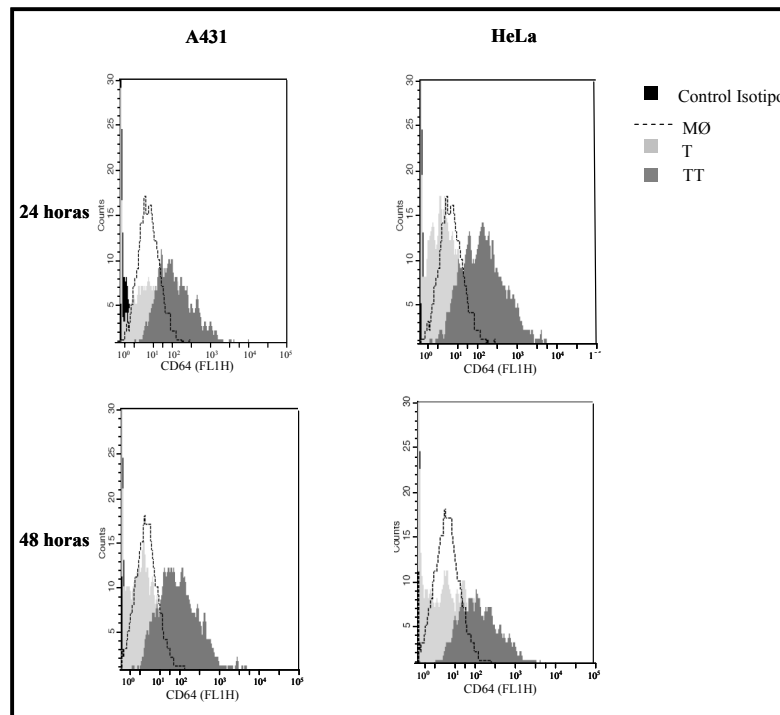


Figura R21. Histogramas de la expresión de CD64 en superficie MØ controles, T y TT (24h y 48 h) se marcaron con anticuerpos específicos para la proteína de superficie CD64 como se describe en Material y Métodos, y se les analizaron por citometría de flujo. Se muestran una selección de histogramas típicos ($n=3$).

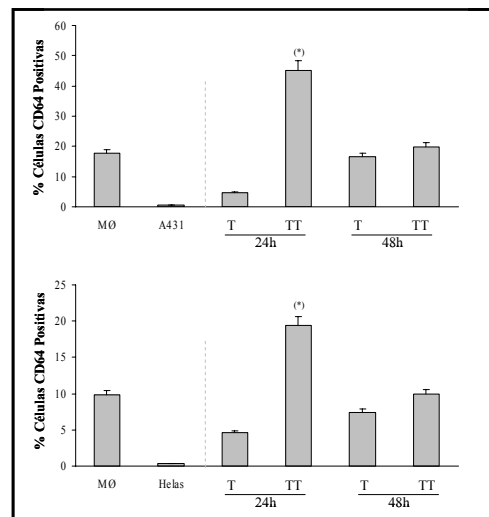


Figura R22. Expresión de CD64 en superficie Análisis del porcentaje de células CD64 positivas, respecto al control isotipo. (*) $p<0,05$ de TT con respecto a T, ($n=3$).

Una vez comprobada la expresión de CD64, procedimos a comprobar si estos MØ presentan una mayor capacidad fagocítica tal y como se prevé. Con este objetivo hicimos un ensayo estándar de fagocitosis utilizando bacterias marcadas con proteína fluorescente verde, GFP (del inglés Green Fluorescent Protein,). Después de ser sometidos a las condiciones experimentales T o TT, se aislaron los MØ como en los puntos anteriores, y se les enfrentó a las bacterias. También hicimos el mismo procedimiento a los MØ controles. Posteriormente al ensayo, se comprobó la intensidad de fluorescencia a través de citometría de flujo y acompañados de un estudio por microscopia de fluorescencia (Figura R23 A y B). Decidimos extender el experimento de fagocitosis hasta las 48 horas para detectar si el efecto se agudizaba con el tiempo.

La figura R23A muestra el porcentaje de células fluorescentes para GFP y se aprecia que, en los tiempos 24 y 48 horas, los TT desarrollan mayor capacidad fagocítica que los T. Este mismo efecto se puede apreciar en las fotos representativas de los experimentos que se muestran en el panel B de la misma figura R23 (ver flechas) .

Nuestros datos relacionan por la primera vez la mayor expresión de CD64 por parte de los TT con la inducción de su capacidad fagocítica en comparación con los T. Indicando que estas células tienen sobre activada la maquinaria de fagocitosis, hecho que puede tener implicaciones en diferentes contextos clínicos.

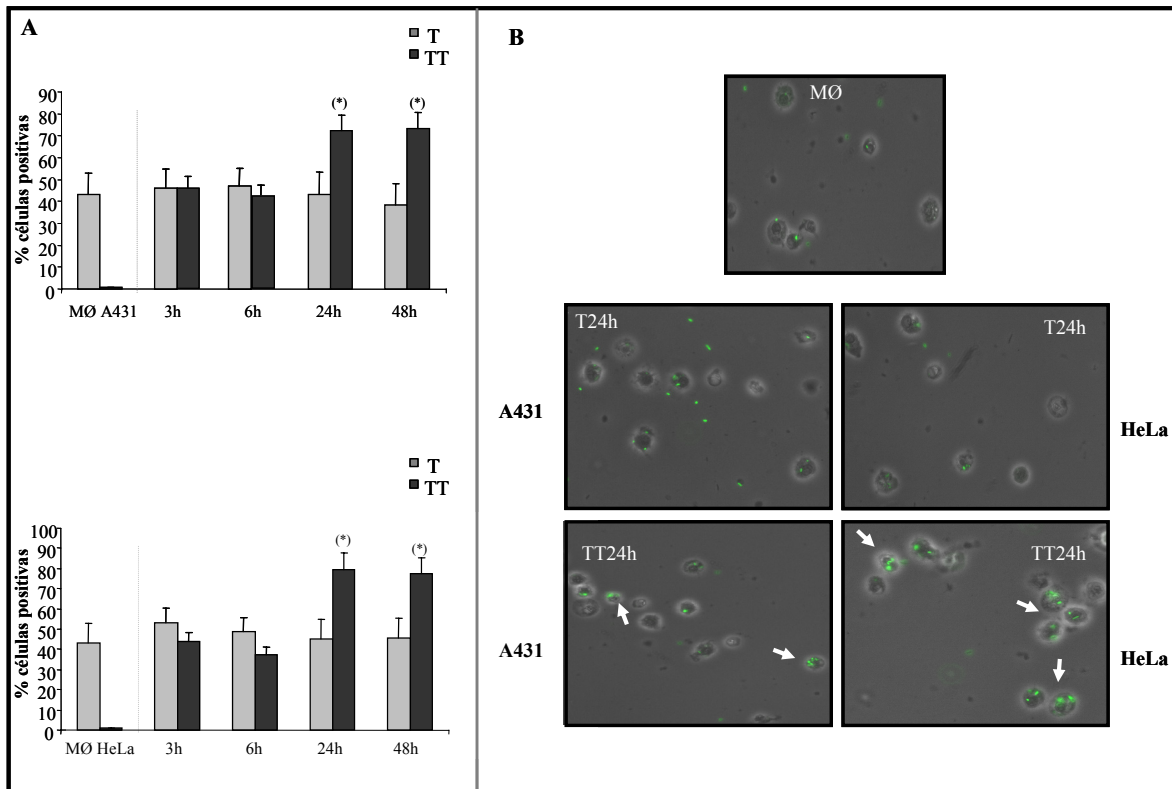


Figura R23. Capacidad Fagocítica de T y TT

MØ controles, T, TT y las líneas tumorales A431 y HeLa, de los experimentos de las figuras R20 y R21, fueron expuestos a bacterias *E. coli* DH5α (~10⁸ bacteria/ml) durante 1 hora. Estas bacterias expresan GFP inducido por IPTG (ver Material y Métodos). Las células adheridas fueron colectadas y analizadas por citometría de flujo (A) o por microscopía de fluorescencia (B). En (A) se representa el porcentaje de células positivas respecto al control isotipo durante los tiempos indicados. En el panel superior, experimento hecho con A431. En el panel inferior, experimento hecho con HeLa. En (B) se muestra un experimento hecho con A431 y HeLa. Las flechas indican las bacterias fagocitadas por los TT. (*) $p < 0,05$ de TT con respecto a T.

3.6. Expresión de HLAs y presentación antigénica de los TT

Es conocido que la expresión de CD64 está relacionada con una baja presentación antigénica (91, 93). En el epígrafe anterior, demostramos que los TT presentan altos niveles de esta molécula de superficie. Por otra parte, los análisis de microarrays indican que estas células tienen baja expresión de algunos HLA de clase II en comparación con los T (ver Tabla R2, Cluster III). Estudios anteriores han sugerido

la existencia de una desregulación de la expresión de haplotipos del HLA II en TIM (31, 59). Por ello, decidimos valorar estos genes en nuestro modelo estudiando su expresión tanto a nivel trascricional como traduccional.

Primeramente analizamos la expresión a nivel transcripcional de HLA-DQ β 1, y HLA-DR β 1, ambos reprimidos en TT según nuestro microarray y reconocidos por su mayor implicación en la presentación antigénica (59). En este caso volvimos a estudiar el efecto de las cuatro líneas tumorales usadas.

Como habíamos hecho en los ensayos anteriores, los análisis de expresión de estas moléculas los realizamos después del aislamiento de las células CD14+ que se sometieron a las condiciones experimentales T y TT. Las figuras R24 y R25 muestran los resultados de Q-PCR para HLA-DQ β 1 y HLA-DR β 1, respectivamente. En ambos casos se aprecia que los T aumentan la expresión de estas molécula (con cinética que depende ligeramente de la línea tumoral), mientras que en los TT se mantienen los niveles basales.

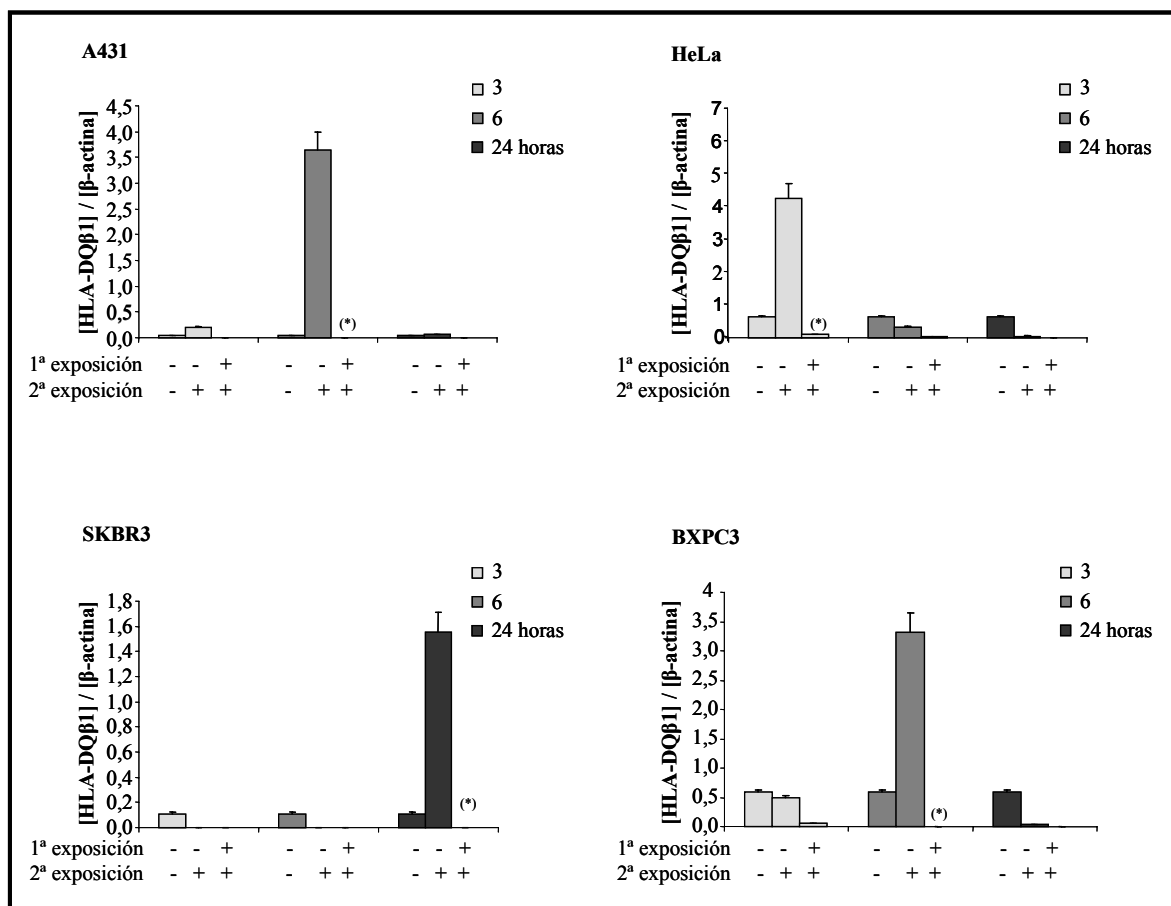


Figura R24. Expresión de HLA-DQβ1 a nivel transcripcional

MØ humanos se sometieron a las condiciones experimentales T y TT. Después, se aislaron las células CD14+, se les aisló el ARN total y se sintetizó ADNc. Así, por Q-PCR valoramos la expresión de HLA-DQβ1 y β-actina en función del tiempo. Analizamos la relación gen / β-actina. *MØ* controles (1ª barras), T (2ª barras) y TT (3ª barras). Cada gráfica corresponde al experimento hecho con una línea tumoral, según lo indicado en la figura (n=3). (*) $p < 0,05$ de TT con respecto a T.

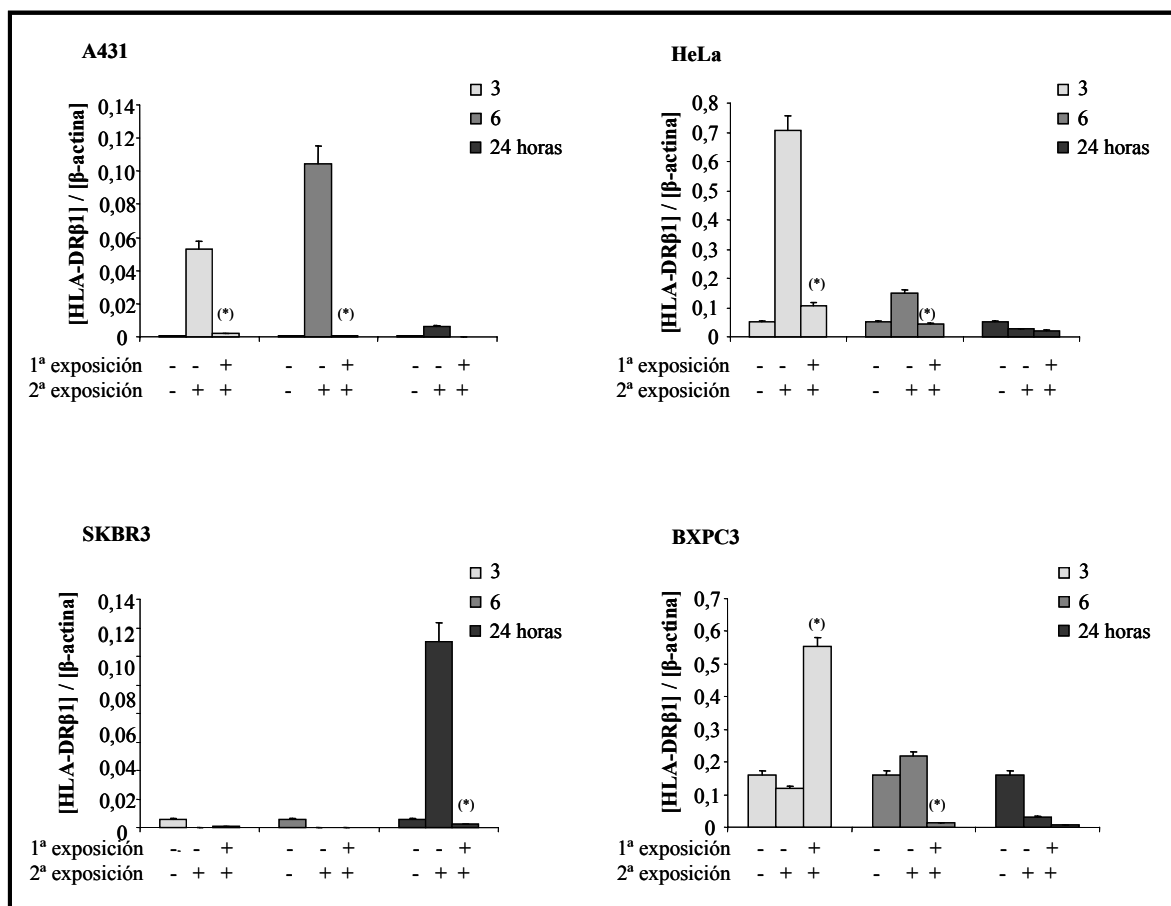


Figura R25. Expresión de HLA-DRβ1 a nivel transcripcional

MØ humanos se sometieron a las condiciones experimentales T y TT. Después, se aislaron las células CD14+, se les aisló el ARN total y se sintetizó ADNc. Así, por Q-PCR valoramos la expresión de HLA-DRβ1 y β-actina en función del tiempo. Analizamos la relación gen / β-actina. MØ controles (1ª barras), T (2ª barras) y TT (3ª barras). Cada gráfica corresponde al experimento hecho con una línea tumoral, según lo indicado en la figura (n=3). (*) $p < 0,05$ de TT con respecto a T.

A continuación, analizamos la expresión a nivel proteico de HLA-DQ, HLA-DR y la proteína chaperona HLA-DM. Decidimos incluir en este análisis a HLA-DM por su importancia en la captación de los péptidos antigénicos (28). La figura R26 muestra que, efectivamente, disminuye la expresión de HLA-DQ y DR en los TT comparado con los T. Sin embargo, el HLA-DM está sobre expresado en los TT a las 24 horas, no presentando diferencias significativas de expresión en los tiempos más tempranos. Además, analizamos la expresión de estas moléculas en los controles de los tratamientos, los MØ y las respectivas líneas tumorales (Figura R27). Como era esperado, los MØ presentan expresión de todos los haplotipos.

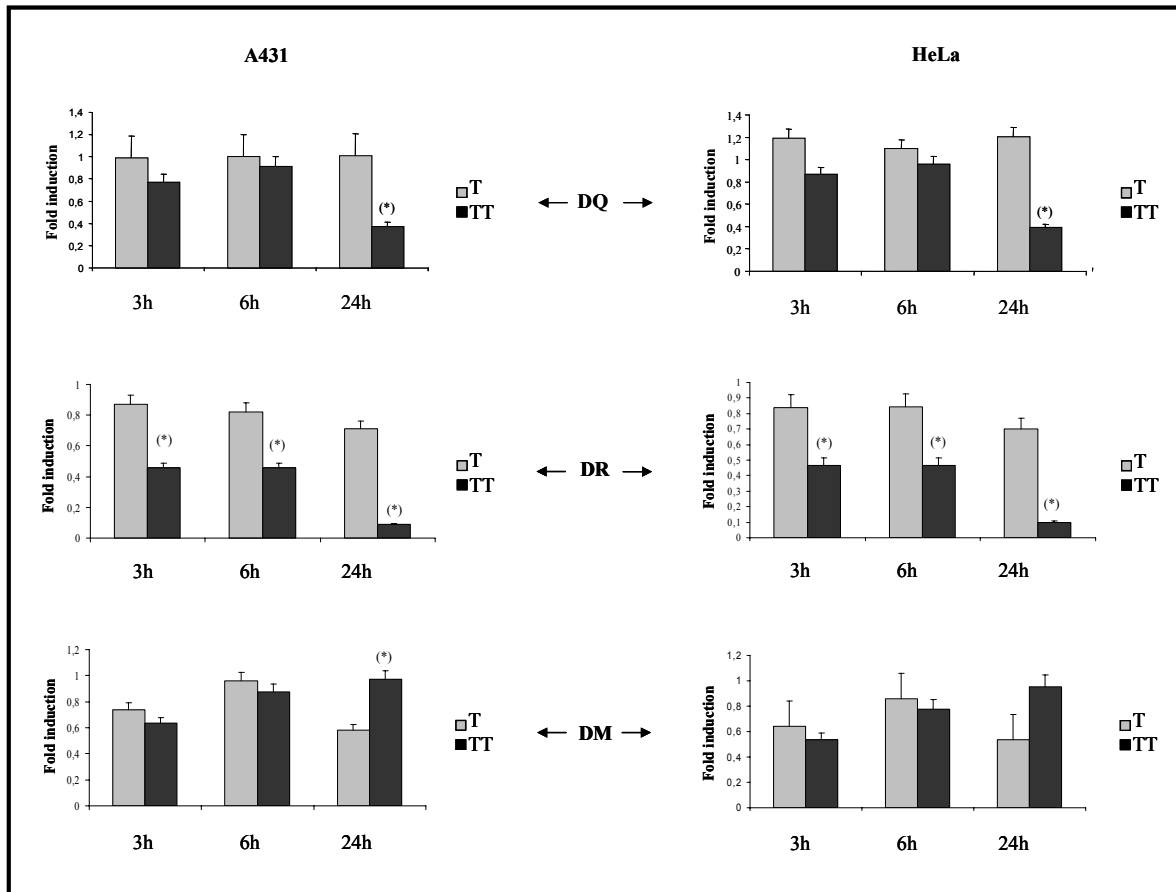


Figura R26. Expresión de proteica de DQ DR y DM en T y TT.

MØ humanos se sometieron a las condiciones experimentales T y TT (3, 6 y 24h). Las células CD14⁺, previamente aisladas, se marcaron con anticuerpos específicos: anti-DQ, anti-DR y anti-DR. El panel izquierdo muestra los experimentos realizados con A431 y el derecho los correspondientes a los ensayos con HeLa. Valores obtenidos (fold induction) con respecto al MØ, n=3, (*) $p < 0,05$ de TT con respecto a T.

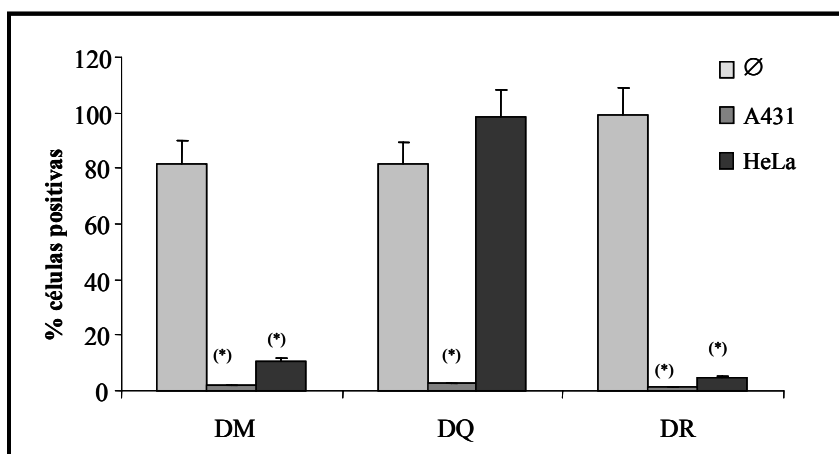


Figura R27. Expresión proteica de DQ DR y DM en las líneas tumorales.

Las líneas tumorales A431 y Hela y los MØ controles se marcaron con anticuerpos específicos para las proteínas de HLA de clase II: DM, DQ y DR, y se analizaron por citometría de flujo, como se describe en Material y Métodos. Valores obtenidos por el porcentaje de células positivas respecto al control isotipo, $n=3$. (*) $p<0,05$ de las líneas tumorales con respecto a los MØ.

A pesar de la disminución de la expresión del haplotipo DQ, el que más nos llamó la atención fue el DR por presentar una disminución en la expresión de 7 veces en los TT en el punto experimental de 24 horas (Figura R26) Para verificar si esta disminución perduraba en el tiempo, extendimos el experimento hasta las 48 horas y analizamos la expresión de los tres haplotipos de HLA-II. La figura R28 muestra que, tal y como esperábamos, se observa una disminución de los haplotipos DQ y DR a las 48 horas.

De los resultados anteriormente expuestos entendemos que la expresión de los HLA está significativamente afectada en los TT. Este fenómeno puede tener su origen en una desregulación del CIITA (del inglés Class II Trans-Activator). Este factor se ha establecido como un elemento esencial en la regulación de la expresión de los genes que codifican para los HLA II. Por otra parte, CIITA lo encontramos en el en el cluster III de nuestros *microarrays* (Tabla R2).

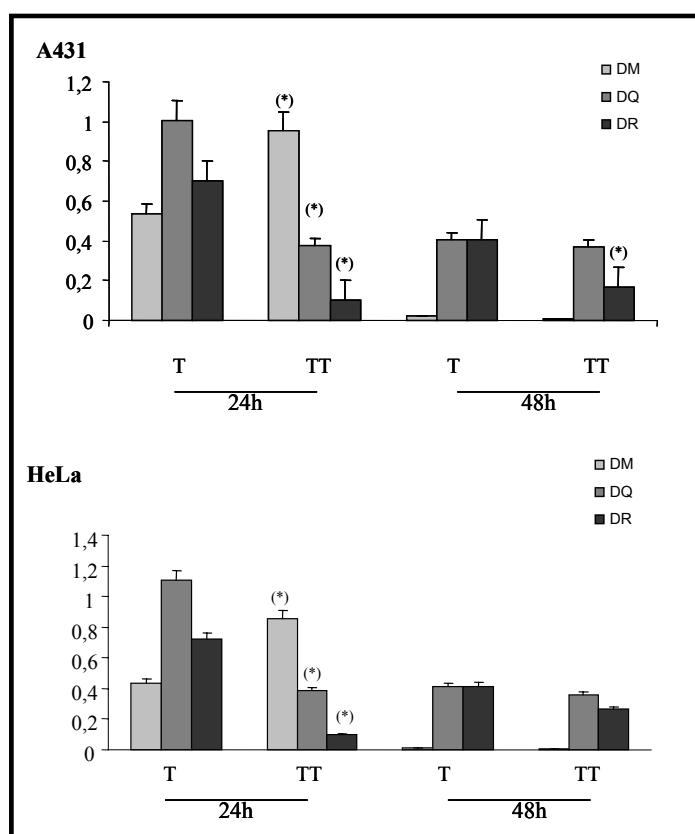


Figura R28. Expresión proteica HLA-DM, DQ y DR (extendido a 48 horas).

MØ controles, T y TT (24 y 48h) se marcaron con anticuerpo específico para HLA-DR y se analizaron por citometría de flujo. En ambas gráficas se representa la inducción de células positivas respecto a los *MØ* controles, $n=3$. (*) $p<0,05$ de TT con respecto a T.

Tal y como se puede apreciar en la figura R29, hemos analizado que los TT presentan una considerable disminución en la expresión de las variantes de splicing III y IV así como la molécula entera de CIITA. La variante I no está expresada por los T o TT (dato no mostrado). Cabe destacar que en este análisis trascricional volvimos a estudiar el efecto que provocan las cuatro líneas tumorales usadas en nuestro estudio, con la misma intención que tuvimos cuando realizamos los análisis de Q-PCR para los genes HLA-DQ β 1 y DR β 1.

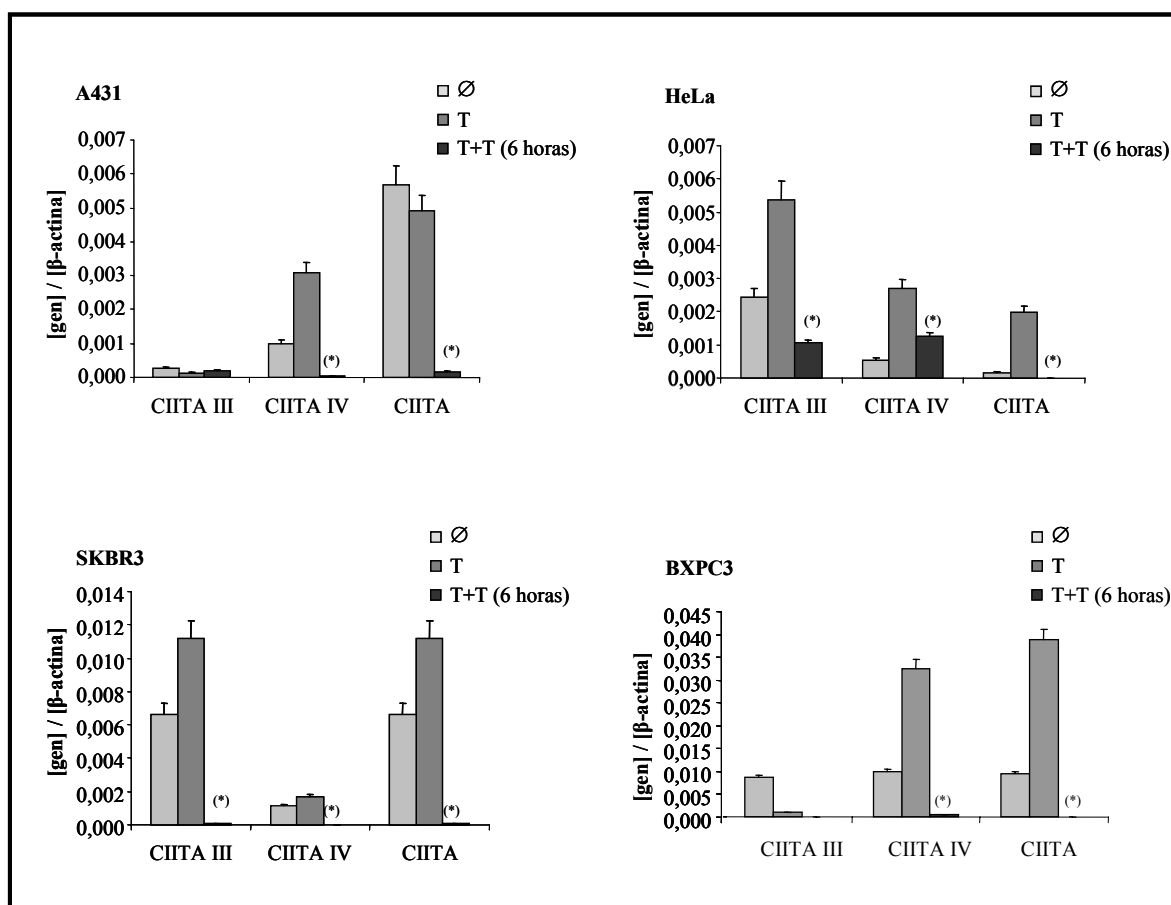


Figura R29. Expresión de CIITA a nivel transcripcional

MØ humanos se sometieron a las condiciones experimentales T y TT. Después, se aislaron las células CD14+, se les aisló el ARN total y se sintetizó ADNc. Por Q-PCR valoramos la expresión de CIITA (y sus variantes de splicing III, IV) y β -actina en función del tiempo. Analizamos la relación gen / β -actina. MØ controles (1ª barras), T (2ª barras) y TT (3ª barras). Cada gráfica corresponde al experimento hecho con una línea tumoral, según lo indicado en la figura (n=3). (*) $p < 0,05$ de TT con respecto a T.

Finalmente, confirmamos el impacto funcional de la disminución en la expresión de CIITA/HLA II, a través del ensayo estándar de proliferación de linfocitos (siguiendo el protocolo que se describe en M & M y las referencias: (80, 94).

La figura R30 muestra que los TT bajan significativamente su capacidad de inducir la proliferación de linfocitos tras 24 horas de co-cultivo, en comparación con los controles y con los T. Nuestros resultados muestran por primera vez que, en el modelo experimental utilizado en este trabajo, los TT presentan aumento en la expresión de

CD64 y de su capacidad fagocítica, también exhiben baja expresión de HLA-DQ y DR y fallo en la activación de linfocitos, pudiendo ser una de las explicaciones de su perfil inmunosupresor.

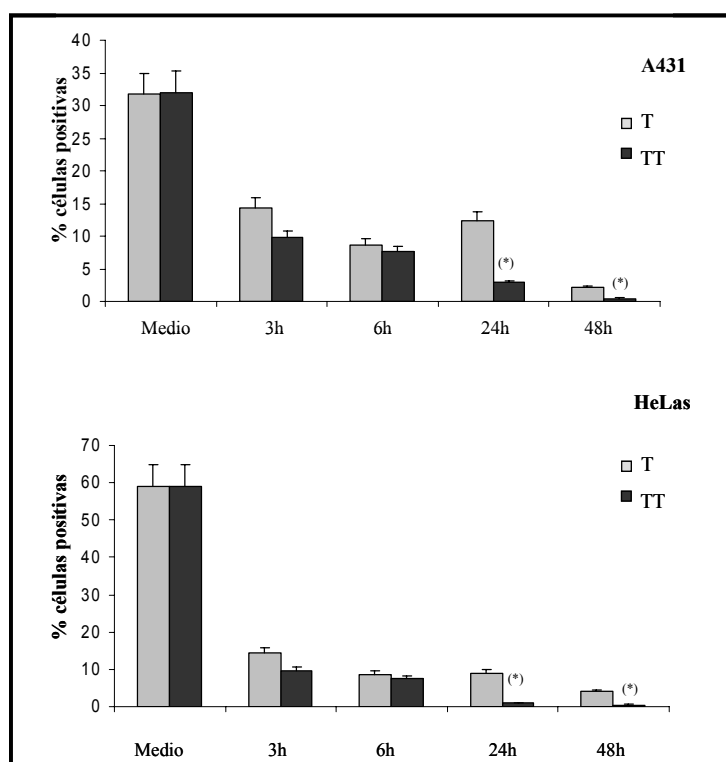


Figura R30. Proliferación de Linfocitos.

Linfocitos heterólogos humanos se “tiñeron” con el marcador de membrana PKH2 (Green Fluorescent Cell Linker Kit) como se describe en Material y Métodos. Tras la tinción, los linfocitos marcados se co-cultivaron con los MØ controles, T y TT durante los tiempos indicados en las gráficas (proporción 1:5 MØ:linfocitos). Después de 3 días del co-cultivo, las células no adheridas (linfocitos) se colectaron y se marcaron con el anticuerpo anti-CD3-PE y se analizaron por citometría de flujo. La proliferación de linfocitos fue medida por la pérdida de la intensidad de fluorescencia del PKH2. Se utilizaron linfocitos cultivados solos, como control negativo de la proliferación, (n=3). (*) $p < 0,05$ de TT con respecto a T.

3.7. Papel del HLA-DR en el fenotipo TT estudiado

Nuestros experimentos indican que HLA-DR es, de los miembros del HLA clase II estudiados, el que presenta los niveles más bajos de expresión en los TT (ver figura R26). Según nuestros datos, su represión puede estar mediada por la regulación que

sufre CIITA en este contexto (ver figura R29). En un estudio previo se demuestra que los TIMs de pacientes con cáncer de páncreas también presentan una marcada baja expresión de esta molécula, correlacionándose este hecho con un peor pronóstico (59). Con el objetivo de ahondar en el papel que juega el HLA-DR en el fenotipo inmunosupresor de los TT, realizamos un ensayo de proliferación similar al descrito anteriormente (Figura R30) añadiendo un anticuerpo bloqueante anti-HLA-DR.

En la figura R31 se puede apreciar que los T que recibieron el estímulo bloqueante para HLA-DR disminuyen su capacidad de activación de linfocitos. Sorprendentemente, esta disminución llega a equipararse a los TT en el experimento hecho con A431 (48 horas) o en aquél hecho con HeLa en los puntos de 24 y 48 horas. De esta manera se demuestra que el bloqueo de HLA-DR dificulta la capacidad activadora de la respuesta adaptativa en los T que, en estas condiciones, muestran un fenotipo similar al que exhiben los TT.

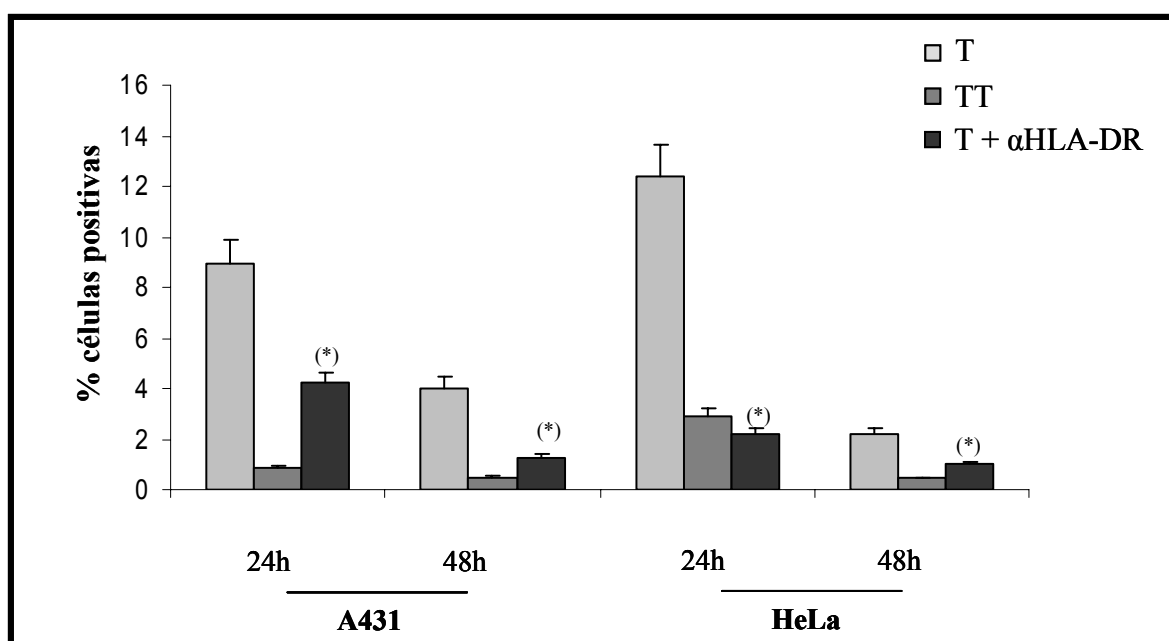


Figura R31. Proliferación de Linfocitos tras bloqueo de HLA-DR.

Ensayo similar al de la figura R29. En la condición T + αHLA-DR se utilizó 5 μg del anticuerpo bloqueante tal y como se describe en Material y Métodos, (n=3). (*) $p < 0,05$ en T + αHLA-DR con respecto a T.

Estos datos respaldan las evidencias de que los TIMs pierden la capacidad de eliminar al tumor, no sólo por revertir su perfil inflamatorio, sino también porque tienen “mermada” su actividad presentadora de antígenos tumorales a los linfocitos, imposibilitando la activación de la respuesta adaptativa.

DISCUSIÓN

4. Discusión

El estudio de las interacciones entre MØ y células tumorales ha despertado mucho interés en las últimas décadas. A pesar de los avances en este campo, aún nos falta por definir muchos mecanismos moleculares involucrados en este fenómeno.

La visión general de la relación que se establece entre los TIM (TT) y las células tumorales, se muestra en la figura D1. Resumidamente, los MØ circulantes son reclutados al sitio del tumor a través de factores quimiotáticos liberados por las células tumorales tales como MCSF-1 y la quimioquina CCL2 (del inglés Chemokine C-Cmotif Ligand 2). Una vez infiltrados en el tumor, los MØ y las células tumorales inician una especie de cooperación, la cual es mantenida por la producción de citocinas, factores de crecimiento y proteasas. De este modo, los MØ se acumulan en el tumor porque el MCSF-1 garantiza su supervivencia y la presencia de IL-6 e IL-10 en el microambiente tumoral impiden su diferenciación a células dendríticas. Por otra parte, la PGE₂ (del inglés Prostaglandina E₂) liberada por las células tumorales, inhibe la producción de TNF α , IL-12 (95) y óxido nítrico por los MØ induciendo su actividad inmunosupresora (22, 24, 96).

También es conocido que los MØ producen MMPs, PDGF (del inglés Platelet Derived Growth Factor) y VEGF, factores que promueven la supervivencia y proliferación de células tumorales, la angiogénesis y la metástasis (7, 22, 63, 69). De nuestros resultados de microarrays se puede apreciar que los TT presentan expresión diferencial de MMP7, MMP9, PDGFA / B, VEGFA y TGF β (Tabla R2). Según la figura D1, los TT también producen quimioquinas que auxilian la angiogénesis y la remodelación de la matriz extra celular (22). Nuestros resultados de microarrays también demuestran la expresión diferencial de algunas quimioquinas (ver Tabla R2, cluster I y III).

Si establecemos el sistema de referencia en el MØ, centro de este estudio, cuando estos se “encuentran” con las células tumorales activan una respuesta inflamatoria en pocas horas (20, 27, 81). Después de esta activación, los MØ reprograman su respuesta favoreciendo la progresión tumoral tal y como hemos ido comentando a lo largo de este trabajo (19, 22). El proceso de reprogramación es en parte conocido, pero sus mecanismos moleculares todavía están en vías de estudio.

Según algunos autores, este tipo de reprogramación implica la disminución de la producción de TNF α , IL-12 e IL-23 (20, 63, 81). Estos resultados fueron observados en

modelos animales (62) y humanos (63, 69). Sin embargo, en ningún caso se utilizó un modelo humano *in vitro* que proporcionara MØ equiparables a los que se infiltran en el tumor. Tampoco se ha comparado el perfil de los MØ que han experimentado sólo un contacto con aquellos que ya están infiltrados en los tumores. Estos estudios son muy importantes porque los MØ son la población predominante de leucocitos infiltrados en tumores (9, 27). Cabe destacar que algunos trabajos indican que la infiltración propicia el cambio en el perfil del MØ (20), pudiendo significar una mala prognosis (97).

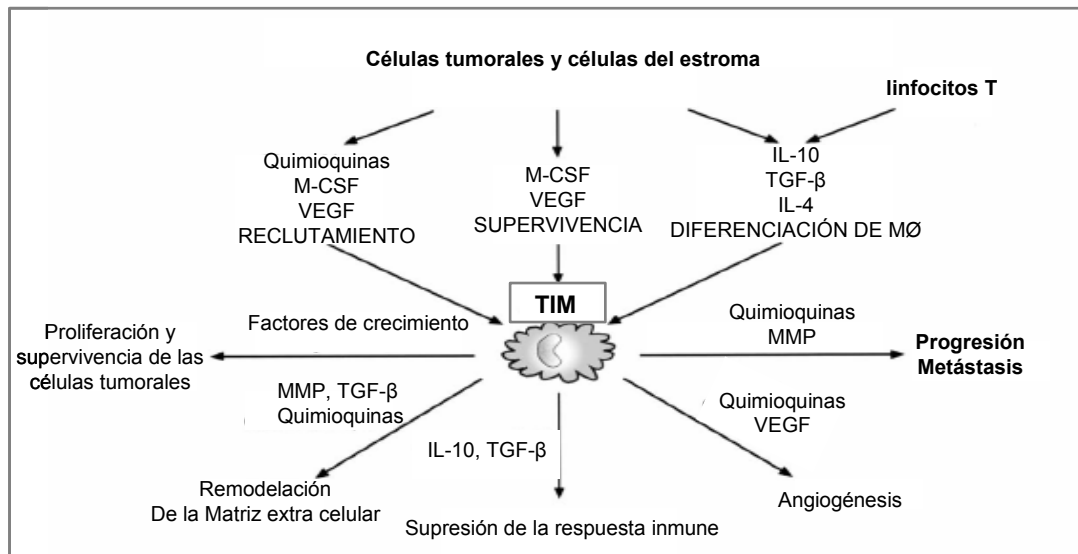


Figura D1. Interacción entre TIM (Tumor infiltrated Macrophage) y células tumorales. Modificada de Mantovani, et al, 2004 (22).

Por todo ello, en el presente trabajo se desarrolló un modelo que nos permite obtener *in vitro* MØ humanos similares a los TIM. Este modelo presenta unas características generales descritas en la tabla R1 y se refleja en las condiciones experimentales que llamamos de T y TT (ver Figura R2). En el caso de T quisimos simular el primer contacto de un MØ con el tumor, mientras que con la condición TT simulamos MØ infiltrados en el mismo, lo que significa que estas células llevan más tiempo en contacto con la célula tumoral.

De acuerdo con publicaciones anteriores los TT reducen de manera significativa la producción de la citocina inflamatoria $TNF\alpha$, inducida por la condición experimental T (19, 63). Además, los TT también presentaron disminución en la producción de otras citocinas pro-inflamatorias y activadoras de la respuesta adaptativa como IL-12p40 e IL-23p19 en plena concordancia con lo descrito anteriormente (62, 74).

Según nuestros análisis de microarrays, los T y TT presentan diferencias entre sí y con respecto a los MØ controles. Se puede observar en la figura R6, a través de los mapas GEDI, que nuestras réplicas presentan un perfil significativamente similar y que existen características muy semejantes entre los experimentos hechos con independencia de la línea tumoral empleada. Tanto la similitud entre las diferentes réplicas, como entre los experimentos realizados con líneas tumorales distintas, muestran la consistencia de nuestro estudio.

Sorprendentemente, en los mapas GEDI (Figura R6), los TT a las 24 horas presentaran un transcriptoma análogo al de la célula tumoral correspondiente a su experimento (A431, HeLa, SKBR3 o BXP3, según sea el caso). Pensábamos que pudiera ser una contaminación de células tumorales, a pesar de haberlo comprobado por citometría de flujo y detectar una alta eficiencia de separación que se reflejó en 94% de células CD14⁺ (Figura R3). Aún así, creíamos que las células tumorales pudiesen presentar mayor proliferación en los tiempos más tardíos, lo que dificultaría la eficiencia del aislamiento de células CD14⁺. Esta posibilidad fue descartada luego de verificarlo tanto a través del cultivo prolongado de estas células, como de su inyección en ratones inmunosuprimidos. En estos ensayos confirmamos que los TT (24 horas) no presentaron capacidad proliferativa o de desarrollo tumoral como las líneas *per sé* (Figura R7). Estos datos indican que hay otras razones que expliquen porque ocurre este fenómeno que se puede apreciar a través de los resultados de microarrays. Una explicación puede ser que la similitud entre TT (24 horas) y células tumorales esté relacionada a un tipo de fagocitosis con fallos en el procesamiento y/o presentación antigénica, lo que comentaremos más adelante.

A continuación de estas observaciones elegimos clusters de interés en nuestros mapas GEDI. Estos clusters fueron seleccionados en base a las diferencias observadas entre los tratamientos T y TT (Figura R8) y mediante el programa Ingenuity obtuvimos la lista de genes de cada cluster según su función biológica. Observamos que efectivamente los genes que aumentan su expresión en TT son mayoritariamente aquellos responsables de diversos procesos tumorales. Mientras que los genes que se reprimen son algunos de los responsables de orquestar una respuesta inmune apropiada (Figura R9 y Tabla R2). La combinación de estos datos nos indica que los TT pueden colaborar con la progresión tumoral no sólo porque presentan un perfil inmunosupresor, sino que también empiezan a sobre expresar genes característicos de los procesos cancerígenos. En estos casos cabe destacar que los T y TT presentan niveles de

expresión diferencial para estos genes, según la valoración dada por el programa Ingenuity (datos no mostrados), y que puede ser visualizado a través de la figura R6.

Debido al gran volumen de grupos de genes interesantes con expresión diferencial que arrojaron los experimentos de microarrays, decidimos centrar nuestro trabajo en aquellos que están directamente conectados con la respuesta inmune, dejando para futuros estudios el resto.

De manera general los análisis que realizamos muestran que nuestros TT presentan un perfil similar aquél descrito para los M2 o TIM (20, 69) y los T son equiparables a los M1 (20). Esta conclusión se puede visualizar en la tabla comparativa que mostramos a continuación (Tabla D1).

Moléculas			
	TT	TIM de ratón. Mantovani, <i>et al</i> , 2006 (62)	TIM humano de cáncer de ovario. Duluc, <i>et al</i> , 2008 (69)
TNF α	-	-	-
IL-12	-	-	-
IL-23	-	no mencionado	no mencionado
IL-10	+	+	+
IRAK-M	+	no mencionado	no mencionado
rTREM-1	+	no mencionado	no mencionado
CD86	-	no mencionado	-
CD163	+	no mencionado	-
LIF	+	no mencionado	+
IL-6	+	+/-	+
CD64	+	no mencionado	no mencionado
HLA-DR	-	no mencionado	no mencionado
CIITA	-	no mencionado	no mencionado
NF- κ B2 / p100	+	no mencionado	no mencionado

Tabla D1. Comparación de expresión de moléculas por nuestros TT y los TIM de estudios distintos (62, 69).

Las señales significan: – baja expresión, + alta expresión, +/- expresión presente pero más baja que los controles utilizados. En el caso de LIF e IL-6 del estudio de Duluc, *et al*, 2008, no se demuestra si son producidos por los TIM o por las células tumorales.

Si analizamos en particular el estudio de Duluc *et al*, 2007, donde se comparó la producción de citocinas por los TIM con MØ cultivados en medio condicionado de células tumorales, o estimulados con LPS (lo que les induce al perfil M1) (69). Estos

autores concluyen que los TIM tienen un perfil similar al de nuestros TT: aumento en la expresión de la citocina antiinflamatoria IL-10 (Figura R5), y disminución de citocinas pro-inflamatorias como TNF α e IL-12 (Figuras R10 y 11). A pesar de las semejanzas entre este estudio y el nuestro, opinamos que es más real que se compare los perfiles de T y TT, y no TIM con MØ estimulado con LPS (69).

Por otra parte, en otro estudio se utilizaron modelos de co-cultivo de MØ con células tumorales, sin que hubiese contacto entre las dos células porque el co-cultivo se realizó en placas *transwell* (74). En este modelo se obtuvieron TIM con aumento en la expresión de TNF α (74), es decir, lo contrario de lo publicado por otros autores (19, 20, 63). Seguramente hay explicaciones para estos resultados discordantes. Una de ellas es que los leucocitos y células tumorales están en contacto directo en el microambiente tumoral *in vivo*. Por ello, debe ser crucial el contacto entre las dos células también en los modelos para obtención de TIM *in vitro*, ya que la utilización de modelos tan distintos puede traer resultados paradójicos. En nuestra experiencia, el perfil que se obtiene cuando se cultivan MØ en sobrenadante de células tumorales, no es estrictamente igual al que exhiben estas células cuando existe el contacto real (datos no mostrados). A parte de este estudio, existen otros que confirmaron que la inflamación mediada por TNF α y la cascada de señalización de NF- κ B contribuyen con la progresión tumoral (74, 85, 98).

De esta manera, las diferencias en la expresión de TNF α de los TT/TIM pueden ser un reflejo de los cambios en la dinámica del microambiente tumoral. Uno de estos cambios puede ser la modulación de la actividad de NF- κ B que presenta sus mayores niveles en los estadios más tempranos del desarrollo neoplásico (20, 32, 74, 85), propiciando la transición de M1 a M2. Los M2 presentarían una disminución en la actividad de NF- κ B, lo que les imposibilitaría producir varias citocinas inflamatorias, entre ellas el TNF α que en esta fase serían responsables de “atacar” al tumor. En este sentido, hay autores que afirman que el MØ llega al tumor y pasa de ser pro-inflamatorio a pro-angiogénico (32). Por lo tanto, creemos que la disminución en la expresión de TNF α por los TT contribuye a establecer su perfil inmunosupresor.

Postulamos que las diferencias en la producción de TNF α y otras discrepancias existentes entre los perfiles de los TT pueden ser explicadas, en parte, por el uso de modelos distintos en determinados estudios. Así, cada uno de estos modelos puede representar una fase distinta del cambio en la interrelación entre MØ y tumor. Sin embargo, también es importante considerar el tipo de tumor en cuestión, la línea celular

que le originó, su microambiente y las poblaciones celulares existentes en él. Un ejemplo de ello es que en un modelo de tumor de hígado, la delección selectiva de NFκ-B en hepatocitos, o incluso la inhibición de TNFα producido por células parenquimales residentes en el entorno tumoral, indujo la apoptosis a los hepatocitos “transformados” disminuyendo la incidencia de este tipo de cáncer (98). De todos modos, este estudio se basa en el inicio del proceso neoplásico cuando la producción de TNFα puede estar auxiliando la progresión tumoral. Merece la pena destacar aquí que nuestros resultados no distinguen diferencias entre los distintos tipos de líneas utilizadas, por lo menos en la expresión de los genes que comprobamos.

Asimismo, en el proceso tumoral *in vivo* es inevitable la producción de TNFα por otras células (incluso las tumorales) distintas a las TT, ya que en este proceso la disrupción del tejido casi siempre causa inflamación (24). En este sentido, a pesar de que el TNFα producido por el MØ les proporcione un perfil antitumoral, se ha observado que la administración de altas dosis de esta citocina a nivel local favorece el progreso del tumor, ya que proporciona la remodelación del tejido y el desarrollo del estroma (99). Todo parece indicar que el origen, la dosis y el momento de liberación de TNFα le pueden proporcionar funciones totalmente diferentes en el ámbito tumoral.

Aún habiendo algunas diferencias entre los modelos empleados en los distintos estudios acerca de los TT pudimos constatar en nuestro estudio que estas células realmente presentan un perfil similar al descrito para los M2, mientras que los T son similares a los M1, tanto en modelos animales (22) como en modelos humanos (69, 74).

Por otro lado, nuestros datos demuestran que la citocina pro-inflamatoria IL-6 no está únicamente expresada en los T, sino también en los TT. Algunos autores afirman que los TT expresan bajos niveles de esta citocina (20) en conexión con la disminución de la actividad pro-inflamatoria. Las citocinas IL-10 e IL-6 son activadas por la cascada de señalización de STAT3 (del inglés Signal Transducer and Activator of Transcription 3) y en general, la activación de una de ellas induce el bloqueo de la otra (100). STAT3 (Cluster IV) también aparece aumentada por los TT en nuestros resultados de microarrays, hecho que concuerda con los resultados obtenidos de expresión de IL-10 e IL-6. En nuestro modelo observamos la sobre expresión de las dos citocinas (Figuras R13 y R15). Sin embargo, si lo analizamos más atentamente, en los TT los niveles de IL-6 se encuentran altos desde las 3 horas (Figura R13) y la IL-10 empieza a aumentarse a las 24 horas en la mayoría de los casos (Figura R15). Estos datos pueden ser un reflejo en la transición entre los perfiles de M1 y M2. Por otro lado, cabe destacar

que algunos autores afirman que IL-6 juega un papel en la tumorigénesis (101), en la angiogénesis (13, 102) o es inmunosupresora cuando es liberada por los TT (103) o por las células tumorales (69, 103, 104). Esto último puede favorecer el papel desempeñado por los TT y coincide con nuestros datos.

Finalmente, nuestros TT presentan un perfil que avala los estudios publicados anteriormente. Este perfil se refleja en la sobre expresión de IL-10 y reducción en la expresión de TNF α , IL-12 e IL-23 (8, 20, 32, 81, 105). A parte de este perfil básico de TT, nuestros análisis de microarrays nos proporcionan una gama de genes expresados por estas células que no han sido descritos en otros estudios y que algunos de ellos son discutidos aquí y otros serán comprobados en el futuro. En general prestamos atención a aquellos genes que no son encontrados con frecuencia en los estudios de TIM, y que añadido al perfil básico de estas células, nos puede ayudar a avanzar en su caracterización.

En este sentido, solamente un estudio anterior afirma que uno de los perfiles M2 existentes depende totalmente de la presencia de IL-6 y LIF en el microambiente tumoral (69). Nuestros TT presentaron sobre expresión de IL-6 y LIF. Estas dos citocinas no sólo comparten algunas funciones, sino también receptores y ambas son producidas por MØ (82). Cabe resaltar que LIF es una molécula con funciones muy amplias que van desde la preservación de la totipotencialidad de células madre embrionarias (82, 106), hasta la inducción de la diferenciación de células mieloides leucémicas lo cual origina su nombre (82).

Nuestros datos muestran que LIF (Figura R 14) está sobre expresada por los T y TT en concordancia con la expresión de IL-6. Según un estudio, LIF puede ser inducida por TNF α en algunos casos pero no se menciona el contexto tumoral (82). La inducción de LIF por TNF α podría ser otra explicación para la cooperación entre célula tumoral y MØ infiltrados; el TNF α producido por las células tumorales, podría llevar al aumento en la expresión de LIF por los MØ y esto propicia el cambio de su perfil. Asimismo nos queda comprobar esta posible relación entre TNF α y LIF en el contexto tumoral.

Otra molécula que no se utiliza en la caracterización de los TT, pero que fue descrita en un estudio realizado en nuestro laboratorio (19), es IRAK-M. En nuestros análisis de microarrays IRAK-M aparece sobre expresada por los TT. Esta molécula es bien conocida por su capacidad de modular negativamente la respuesta inflamatoria mediada por la activación de los TLRs (47, 49, 54, 107). De acuerdo con lo que se había

descrito anteriormente para MØ tolerantes a tumores (19), nuestros datos muestran que los TT sobre expresan IRAK-M, lo que concuerda con la disminución de la expresión de TNF α tanto a nivel transcripcional (Figura R16) como traduccional (Figura R20). Así, la sobre expresión de IRAK-M e IL-10 combinado con la baja expresión de IL-12p40 e IL-23p19, pone en evidencia la actividad inmunosupresora de los TT en nuestro modelo.

Centrándonos en la cinética de expresión de IRAK-M, a pesar de que esté presente en los T, los TT adelantan la expresión de esta pseudoquinasa (Figura R16) a nivel transcripcional. Este dato ya había sido observado en un estudio anterior de nuestro grupo (19). La posible explicación para ello es que la primera exposición al tumor no sólo induce una respuesta inflamatoria temprana a los MØ y activa a IRAK-M, sino que también genera un mecanismo que preconditiona a los MØ de modo que en el segundo enfrentamiento con la célula tumoral se acelera la expresión de IRAK-M. Esta cinética de expresión “acelerada” de IRAK-M por los TT puede señalar la implicación de esta molécula en el papel inmunosupresor de estas células (54). Creemos que la condición experimental T, demostrada aquí como proinflamatoria, debe generar una maquinaria que permita la rápida transcripción de IRAK-M después del segundo enfrentamiento con la célula tumoral. Esta rápida transcripción puede ser explicada por cambios epigenéticos a nivel de cromatina generado por el primer contacto con las células tumorales. Esta cinética de expresión de IRAK-M siempre se repite en nuestros experimentos de MØ tolerantes a tumores, o a LPS como ya ha sido descrito (49) y los mecanismos en él implicados serán nuestro objeto de estudio en el futuro.

No obstante, no se había observado hasta el presente estudio la cinética de expresión de IRAK-M a nivel traduccional en el modelo T/ TT. Nuestros datos demuestran que los TT sobre expresan IRAK-M a nivel proteico durante más tiempo y en mayores niveles que T (Figura R20A). De esta forma, los TT pueden inhibir la activación de la respuesta inflamatoria correspondiente a la cascada de señalización de IRAK-M, durante más tiempo que los T.

En este punto queremos destacar que existen algunos genes que forman parte de la cascada de señalización de IRAK-M, y que presentan expresión diferencial en nuestros microarrays. Entre ellos, se puede observar la presencia de MYD-88 (del inglés Myeloid Differentiation factor 88) e IRAK-1 (Cluster III y IV, respectivamente). Estos y otros genes parecen indicar la existencia de diversos mecanismos importantes que pueden explicar la reprogramación de la respuesta inmune de los TT.

A parte de IRAK-M, otra molécula no utilizada de manera clásica para caracterizar a los TT y que nos llamó la atención que estuviera presente en nuestros datos fue NF- κ B2/p100. La tabla R2 muestra que tanto NF- κ B1 como NF- κ B2 forman parte de los genes del cluster I.

En los análisis de microarrays y en su comprobación por Q-PCR, los T y TT presentaron aumento de expresión de NF- κ B2/p100, una molécula responsable de activar la cascada de señalización no canónica de NF- κ B (86, 87). En nuestros resultados NF- κ B2/p100 aparece sobre expresada en los puntos experimentales más tempranos en TT y su expresión perdura en los T (Figura R18). En este sentido opinamos que a pesar de que el perfil de los TT esté relacionado con inmunosupresión no lo debemos relacionar a “inmunoparálisis”. Como se está constatando, los TT desarrollan un proceso de reprogramación de la respuesta inmune, que implica la activación de muchos genes (Figura R9). En el caso de NF- κ B2/p100, el microambiente tumoral puede estar llevando los TT a otro tipo de activación que puede ser eficiente (o no) contra los tumores, estando relacionada con la activación de la vía no canónica de NF- κ B. Estos datos pueden abrir puertas a un campo de investigación que debe ser desarrollado más profundamente, ya que la mayoría de los estudios relacionados con TT tienen en cuenta solamente la vía canónica de NF- κ B1 (85, 108, 109).

Siguiendo la observación de genes no comúnmente citados en estudios con TIM, TREM-1 ha sido otra molécula que observamos por estar activada tanto en los resultados a nivel transcripcional como a traduccional (ver Figura R17 y R19, respectivamente). En la mayoría de los experimentos esta molécula aparece sobre expresada en TT a nivel transcripcional y presenta un aumento significativo a nivel traduccional, como molécula de superficie comprobado en los análisis de citometría de flujo. TREM-1 ha sido recientemente descrita como amplificador de la respuesta inflamatoria de leucocitos en respuesta a diferentes patógenos (34, 45, 110). A pesar de su clara implicación en la respuesta inflamatoria, hemos publicado recientemente que TREM-1 en superficie puede sufrir un corte proteolítico a través de MMPs (45), y que su forma soluble presenta una actividad antiinflamatoria (111). Nuestros resultados muestran que después de 24 y 48 horas los T generan la forma soluble de TREM-1 (s TREM-1). Estos datos, aparentemente contradictorios, pueden ser explicados por nuestros resultados de expresión en superficie. De esta forma, en la figura R19 se puede apreciar que los TT no disminuyen la expresión de TREM-1 en superficie, por lo tanto, es evidente que no la detectemos en su forma soluble. Lo que no nos queda claro, es si

nuestros TT disminuirían la expresión de la molécula en superficie en el tiempo, como un reflejo de su corte proteolítico generando su forma soluble y consecuentemente una actividad antiinflamatoria. Si los TT produjeran sTREM-1 en el tiempo, su capacidad antiinflamatoria se potenciaría respecto a los T. Esto ocurriría porque los T sobre expresan TREM-1 durante menos tiempo en superficie, lo que resultaría en la producción de una menor cantidad de esta molécula en su forma soluble. Un estudio, recientemente publicado, en pacientes de cáncer de pulmón demostró que sus TT producían altos niveles de TREM-1 en superficie y se generaban grandes cantidades de sTREM-1, este hecho se relacionó con un mal pronóstico de los pacientes (84). Los datos de otros autores (84) y los nuestros pueden abrir posibilidades en el estudio de terapia contra el cáncer utilizando TREM-1, ya que los resultados obtenidos indican que esta molécula juega un papel importante en los MØ enfrentados a tumores.

A parte de las moléculas comentadas hasta el momento estudiamos la expresión de otras, a nivel proteico, que tienen relación con lo descrito para los TT y que aparecen en nuestros resultados de microarrays. A pesar de que algunas hayan sido descritas, apenas se sabe acerca de su función en el contexto tumoral y son pocos los estudios que las utilizan para caracterizar a los TIM.

El CD163, una proteína transmembranal que puede ser inducida por IL-6 (90) o IL-10 (90, 112), generalmente es expresada por MØ (90) y su expresión en TIM ha sido recientemente descrita (69, 90). Nuestros resultados muestran que los T y TT aumentan la expresión de CD163, pero estos últimos presentan un 40% más de células positivas para esta molécula en el punto experimental de 24 horas (Figura R19). De esta forma, CD163 puede ser considerado un marcador para los TT. Consideramos importante detectar el aumento de CD163 tanto a nivel de ARNm como de proteína, porque son pocos los estudios que la consideran en el momento de caracterizar a los TT (69). En este sentido, como los TT presentan expresión variable para algunas moléculas lo que dificulta su caracterización, pensamos que CD163 puede incrementar el perfil de estas células. Además, CD163 es un marcador de la respuesta antiinflamatoria en MØ (113, 114) y se ha descrito su sobre expresión en estas células tratadas con glucocorticoides (115). A pesar de ello poco se sabe acerca de su función en el ámbito tumoral. Pero su papel antiinflamatorio en MØ puede tener total conexión con el perfil de los TT pudiendo desempeñar un papel inmunosupresor importante en el contexto tumoral.

Como en el caso de CD163, la molécula coestimuladora CD86 ya ha sido descrita en estudios de TT (69), pero tampoco es muy utilizada en su caracterización a

pesar de su importancia. CD86 es expresada por MØ y células dendríticas (33, 34) y es una de las moléculas coestimuladoras que más inducen la activación de linfocitos T siendo capaz de revertir la actividad inmunosupresora de las células T reguladoras (116). Nuestros resultados muestran que los TT, a parte de presentar un perfil antiinflamatorio, también presentan una supresión de proteínas importantes para la activación de la respuesta adaptativa, como el caso de CD86 (Figura R19, comparar T y TT 24 horas).

Nuestros datos de expresión de moléculas de superficie nos muestran que los TT, en comparación con los T, aumentan la expresión de la molécula antiinflamatoria CD163 y disminuyen la expresión de la molécula coestimuladora CD86. Estos resultados reafirman el perfil inmunosupresor de los TT.

De acuerdo con estos datos, dos estudios recientemente publicados, de Gordon, *et al*, agruparon evidencias que definen el perfil de MØ activados clásicamente (M1 o T si seguimos nuestra nomenclatura). Según sus estudios, los T expresan en superficie CD86, HLA de clase II, MARCO (del inglés Macrophage Receptor with Collagenous structure), altos niveles de CD14 entre otras moléculas (33, 34). Todos estos factores están significativamente reprimidos en los TT, según nuestros datos. Vale destacar que MARCO también aparece como suprimido en TT (Cluster III).

Otro elemento curioso que resultó del microarrays fue la significativa sobre expresión de CD64 (91, 93). Esta molécula ha sido descrita no sólo como un marcador de la actividad fagocítica (84), sino también como inductora de la disminución en la presentación antigénica de MØ enfrentados a bacterias (86). Nuestros resultados a nivel de proteína para CD64 muestran que los TT sobre expresan esta molécula comparado con los T (Figura R20 y R21). Al analizar el posible efecto que pudiera tener la sobre expresión de CD64 en la fagocitosis por parte de los TT, descubrimos que estos presentan un aumento significativo de la actividad fagocítica. Este resultado, aunque aparentemente alejado del contexto tumoral que nos preocupa, indica que los TT, no sólo mantienen su maquinaria de fagocitosis intacta, sino que la tienen sobre activada. Hecho a tener en cuenta en diversas situaciones patológicas. Además, estos datos sugieren que el macrófago infiltrado puede ser capaz de fagocitar células tumorales.

Por otra parte, se ha relacionado la disminución de la expresión de CD86 y HLA-DR (haplotipo de clase II), con la pérdida de la capacidad presentadora de antígenos en células dendríticas y MØ residentes en granulomas (117). Esta evidencia explicaría, por lo menos en parte, la función de estas moléculas en la activación de

linfocitos T en algunos procesos, incluyendo los tumorales. A parte de nuestros resultados con CD86, también se puede observar en la tabla R2 (Cluster III) que los TT presentan disminución en la expresión de diversos haplotipos de HLA de clase II. Por lo tanto, pensamos que los TT pudieran expresar diferencialmente otros factores adicionales que están implicados en la presentación antigénica.

Los resultados del presente trabajo efectivamente demuestran que los TT sufren una disminución en la expresión de HLA-DQ y DR tanto a nivel transcripcional como traduccional, siendo más significativo en el caso de HLA-DR. Debemos mencionar en este punto que la proteína chaperona HLA-DM, responsable de transportar los péptidos antigénicos, no presenta disminución en los TT hasta las 48 horas. Pensamos que puede ser el reflejo de la activación del procesamiento antigénico en los TT, que luego no se concreta por la baja expresión de las moléculas DQ y DR, que son las que presentarían el péptido antigénico en superficie.

En este contexto es conocido que CIITA es un co-activador transcripcional requerido para la expresión de los genes de HLA, principalmente de clase II (59, 118). Además, en un estudio reciente, se ha observado que CIITA tiene relación con la presentación antigénica (118). Nuestros resultados de microarrays muestran que CIITA presenta expresión diferencial entre T y TT. Estos resultados fueron confirmados por Q-PCR, donde se puede apreciar los bajos niveles de CIITA y sus variantes de splicing en los TT. De esta forma, sugerimos que parte del mecanismo que lleva a la baja expresión de los distintos haplotipos de HLA de clase II en los TT puede tener conexión con la disminución de CIITA.

Teniendo en cuenta estos datos, quisimos profundizar en el estudio de cómo puede afectar la mayor capacidad fagocítica y la disminución de la expresión de HLA-DR y DQ, en la alteración en la presentación antigénica de los TT. Por ello, hicimos ensayos de proliferación de linfocitos (80, 94). En este ensayo comprobamos que los TT presentan un fallo en la presentación antigénica que se refleja en la disminución de su capacidad de activar la proliferación de linfocitos, en comparación con los T (Figura R28). Además, pudimos comprobar que el bloqueo de HLA-DR en los T hace que bajen su capacidad activadora de la respuesta adaptativa, reflejada en la proliferación de linfocitos. Esta bajada en la inducción de la proliferación linfocitaria, que ocurre en los

T tratados con el anticuerpo bloqueante para HLA-DR, se evidencia a las 48 horas de cocultivo y, sorprendentemente, casi les iguala a los TT en este punto experimental.

Queda patente con nuestros resultados, la importancia de HLA-DR en la presentación antigénica de MØ enfrentados a células tumorales. Sin embargo, todavía nos quedan por descifrar muchos mecanismos moleculares involucrados en este fenómeno. Por ejemplo, poco se sabe acerca de la fagocitosis de células tumorales por las APCs (32, 61, 119, 120). Creemos que la expresión de antígenos por las células tumorales, originados de las múltiples alteraciones genéticas que sufren, les puede llevar a ser reconocidas y fagocitadas por las APCs. Sin embargo, debe existir algo que hace que estas células no sean capaces de procesarlas o de presentarlas a los linfocitos. Posiblemente, algunos de los factores presentes en el microambiente tumoral, liberados por las células malignas, sea el responsable de este cambio en la capacidad presentadora de antígenos de los MØ, haciendo que disminuyan su expresión de HLA-II.

A parte de esto, y en conexión con nuestros datos, se observó en otro estudio que la citocina IL-10 puede inducir la disminución de la expresión de HLA-II por los TIM de cáncer de cerebro (121). En este sentido, un estudio en TIM de pacientes con cáncer de páncreas detectó la expresión una molécula de la super familia de los receptores de TNF α , la DcR3 (del inglés Decoey Receptor 3), en las células tumorales. Es conocido que la sobre expresión de DcR3 es capaz de inducir la disminución de HLA-II en los TT, principalmente el haplotipo DR. De esta forma, no sólo el HLA-DR, pero también el DcR3 pueden ser dianas en la investigación de terapia contra el cáncer. Pretendemos comprobar en el futuro el papel de DcR3 en nuestro modelo.

Evidentemente, nuestros resultados de microarrays sugieren la existencia diversos mecanismos que deben ser analizados en el futuro, para ayudarnos a entender los procesos de vigilancia y de edición inmunológica. La vigilancia inmunológica (fase de reconocimiento y “ataque” al tumor, refs:(14, 25-27, 57) fue reproducida con nuestra condición T. Mientras que la fase de equilibrio de la edición inmunológica (momento en que las células malignas desarrollan mecanismos de “escape” y los MØ cambian su perfil frente a los tumores, refs:(14, 25-27, 57) se reprodujo con la condición TT. Siendo uno de los principales resultados de este trabajo el establecimiento de un modelo experimental apropiado para este tipo de estudio.

Recapitulando, nuestros resultados muestran que, a parte del perfil antiinflamatorio de los TT, estas células también presentan alta capacidad fagocítica, seguida de una disminuida actividad inductora de la respuesta adaptativa. Los datos

aquí obtenidos validan, por lo menos en parte, algunos de los mecanismos implicados en la supresión de la actividad inmune de MØ enfrentados a tumores y aporta nuevos elementos a tener en cuenta en este contexto. Entre ellos: la expresión de IRAK-M, TREM-1, LIF y NF- κ B2. La figura D2 agrupa algunas moléculas que pueden ser utilizadas como diana en la terapia contra el cáncer pensando en promover la inmunidad tumoral.

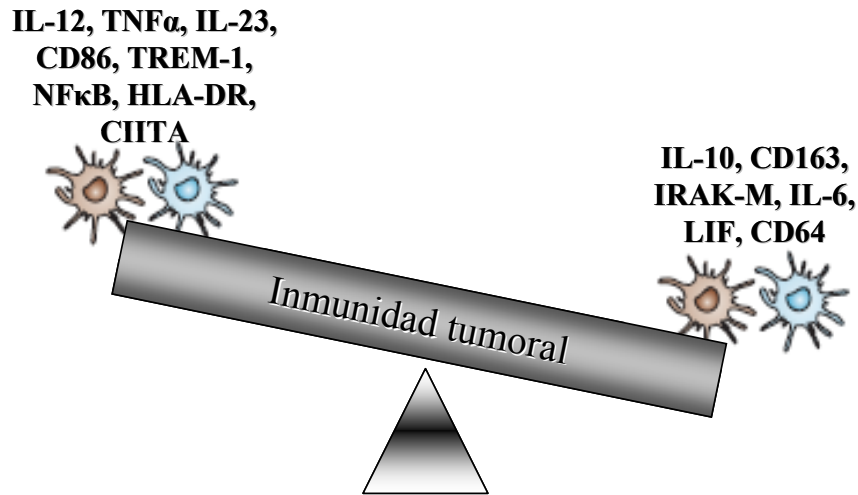


Figura D2. Inmunidad tumoral.

Las células representan a los MØ enfrentados a tumores. La alta producción de moléculas pro-inflamatorias (izquierda) por los MØ aumenta la inmunidad tumoral, mientras que la producción de las antiinflamatoria (derecha) la disminuye.

CONCLUSIONES

5. Conclusiones

Primera: Nuestro modelo T / TT es válido para reproducir las fases de vigilancia y edición inmunológica. Por otra parte, los T manifiestan características similares a los llamados macrófagos de activación clásica o M1, mientras que los TT reproducen el perfil de los macrófagos infiltrados a tumores y los de activación alternativa o M2.

Segunda: Los perfiles T y TT obtenidos para cuatro líneas tumorales diferentes son significativamente similares sugiriendo que, en el contexto tumoral, los macrófagos desarrollan un perfil universal con independencia del cáncer en cuestión.

Tercera: Las células TT presentan una respuesta inflamatoria disminuida, en comparación con T, que se ve reflejada en la producción de IL-10, IRAK-M y la disminución de IL-12 e IL-23.

Cuarta: Las células TT presentan mayor expresión de CD64 lo que está acompañado de un significativo aumento de su capacidad fagocítica.

Quinta: Las células TT disminuyen la expresión de HLA-II y de la molécula coestimuladora CD86. Por otra parte, el regulador CIITA y sus splicing están reprimidos en TT. La combinación de estos factores desencadena una disminución significativa de la presentación antigénica a linfocitos

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. Referencias Bibliográficas

1. Diamandopoulos, G. T. 1996. Cancer: an historical perspective. *Anticancer Res* 16:1595-1602.
2. Haberthur, F. 1993. [Breast cancer in medical history]. *Ther Umsch* 50:366-375.
3. Dobson, J. 1972. Percivall Pott. *Ann R Coll Surg Engl* 50:54-65.
4. Ian F. Tannock, R. P. H. 1992. *the basic science of oncology*. McGraw-Hill, new york.
5. Stearman, R. S., L. Dwyer-Nield, M. C. Grady, A. M. Malkinson, and M. W. Geraci. 2008. A macrophage gene expression signature defines a field effect in the lung tumor microenvironment. *Cancer Res* 68:34-43.
6. Nowell, P. C. 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194:23-28.
7. Ruegg, C. 2006. Leukocytes, inflammation, and angiogenesis in cancer: fatal attractions. *J Leukoc Biol* 80:682-684.
8. Stagg, J., R. W. Johnstone, and M. J. Smyth. 2007. From cancer immunosurveillance to cancer immunotherapy. *Immunol Rev* 220:82-101.
9. Pollard, J. W. 2008. Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer. *J Leukoc Biol* 84:623-630.
10. Cairns, R. A., R. Khokha, and R. P. Hill. 2003. Molecular mechanisms of tumor invasion and metastasis: an integrated view. *Curr Mol Med* 3:659-671.
11. Hagemann, T., J. Wilson, H. Kulbe, N. F. Li, D. A. Leinster, K. Charles, F. Klemm, T. Pukrop, C. Binder, and F. R. Balkwill. 2005. Macrophages induce invasiveness of epithelial cancer cells via NF-kappa B and JNK. *J Immunol* 175:1197-1205.
12. Folkman, J., and Y. Shing. 1992. Angiogenesis. *J Biol Chem* 267:10931-10934.
13. Lin, E. Y., J. F. Li, L. Gnatovskiy, Y. Deng, L. Zhu, D. A. Grzesik, H. Qian, X. N. Xue, and J. W. Pollard. 2006. Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer Res* 66:11238-11246.
14. Nguyen, D. X., and J. Massague. 2007. Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Genet* 8:341-352.
15. Holland, F. 2003. *Cancer Medicine*. United States BC Decker Inc, London.

16. Hanahan, D., and R. A. Weinberg. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.
17. Carlos, T. M. 2001. Leukocyte recruitment at sites of tumor: dissonant orchestration. *J Leukoc Biol* 70:171-184.
18. Stern, R., A. A. Asari, and K. N. Sugahara. 2006. Hyaluronan fragments: an information-rich system. *Eur J Cell Biol* 85:699-715.
19. del Fresno, C., K. Otero, L. Gomez-Garcia, M. C. Gonzalez-Leon, L. Soler-Ranger, P. Fuentes-Prior, P. Escoll, R. Baos, L. Caveda, F. Garcia, F. Arnalich, and E. Lopez-Collazo. 2005. Tumor cells deactivate human monocytes by up-regulating IL-1 receptor associated kinase-M expression via CD44 and TLR4. *J Immunol* 174:3032-3040.
20. Sica, A., P. Larghi, A. Mancino, L. Rubino, C. Porta, M. G. Totaro, M. Rimoldi, S. K. Biswas, P. Allavena, and A. Mantovani. 2008. Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol* 18:349-355.
21. Lin, E. Y., and J. W. Pollard. 2007. Tumor-associated macrophages press the angiogenic switch in breast cancer. *Cancer Res* 67:5064-5066.
22. Mantovani, A., P. Allavena, and A. Sica. 2004. Tumour-associated macrophages as a prototypic type II polarised phagocyte population: role in tumour progression. *Eur J Cancer* 40:1660-1667.
23. Hillen, F., C. I. Baeten, A. van de Winkel, D. Creytens, D. W. van der Schaft, V. Winnepeninckx, and A. W. Griffioen. 2008. Leukocyte infiltration and tumor cell plasticity are parameters of aggressiveness in primary cutaneous melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 57:97-106.
24. Balkwill, F., K. A. Charles, and A. Mantovani. 2005. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 7:211-217.
25. Dunn, G. P., A. T. Bruce, H. Ikeda, L. J. Old, and R. D. Schreiber. 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3:991-998.
26. Khong, H. T., and N. P. Restifo. 2002. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol* 3:999-1005.
27. Reiman, J. M., M. Kmiecik, M. H. Manjili, and K. L. Knutson. 2007. Tumor immunoediting and immunosculpting pathways to cancer progression. *Semin Cancer Biol* 17:275-287.

28. Charles A. Janeway, P. T., Mark Walport, Mark Shlomchik. 2001. *Immunobiology*. Garland Publishing, New York.
29. Abreu, M. T., and M. Arditi. 2004. Innate immunity and toll-like receptors: clinical implications of basic science research. *J Pediatr* 144:421-429.
30. Sherwood, E. R., and T. Toliver-Kinsky. 2004. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 18:385-405.
31. Hagemann, T., T. Lawrence, I. McNeish, K. A. Charles, H. Kulbe, R. G. Thompson, S. C. Robinson, and F. R. Balkwill. 2008. "Re-educating" tumor-associated macrophages by targeting NF-kappaB. *J Exp Med* 205:1261-1268.
32. Lamagna, C., M. Aurrand-Lions, and B. A. Imhof. 2006. Dual role of macrophages in tumor growth and angiogenesis. *J Leukoc Biol* 80:705-713.
33. Gordon, S., and P. R. Taylor. 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5:953-964.
34. Taylor, P. R., L. Martinez-Pomares, M. Stacey, H. H. Lin, G. D. Brown, and S. Gordon. 2005. Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol* 23:901-944.
35. Chen, K., J. Huang, W. Gong, P. Iribarren, N. M. Dunlop, and J. M. Wang. 2007. Toll-like receptors in inflammation, infection and cancer. *Int Immunopharmacol* 7:1271-1285.
36. Lemaître, J. M., R. S. Buckle, and M. Mechali. 1996. c-Myc in the control of cell proliferation and embryonic development. *Adv Cancer Res* 70:95-144.
37. Chen, R., A. B. Alvero, D. A. Silasi, and G. Mor. 2007. Inflammation, cancer and chemoresistance: taking advantage of the toll-like receptor signaling pathway. *Am J Reprod Immunol* 57:93-107.
38. Killeen, S. D., J. H. Wang, E. J. Andrews, and H. P. Redmond. 2006. Exploitation of the Toll-like receptor system in cancer: a doubled-edged sword? *Br J Cancer* 95:247-252.
39. Wu, H., H. Wang, W. Xiong, S. Chen, H. Tang, and D. Han. 2008. Expression patterns and functions of toll-like receptors in mouse sertoli cells. *Endocrinology* 149:4402-4412.
40. Trinchieri, G., and A. Sher. 2007. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* 7:179-190.
41. Akira, S., and K. Takeda. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4:499-511.

42. Huang, B., J. Zhao, H. Li, K. L. He, Y. Chen, S. H. Chen, L. Mayer, J. C. Unkeless, and H. Xiong. 2005. Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. *Cancer Res* 65:5009-5014.
43. Biswas, S. K., P. Bist, M. K. Dhillon, T. Kajiji, C. Del Fresno, M. Yamamoto, E. Lopez-Collazo, S. Akira, and V. Tergaonkar. 2007. Role for MyD88-independent, TRIF pathway in lipid A/TLR4-induced endotoxin tolerance. *J Immunol* 179:4083-4092.
44. del Fresno, C., L. Soler-Rangel, A. Soares-Schanoski, V. Gomez-Pina, M. C. Gonzalez-Leon, L. Gomez-Garcia, E. Mendoza-Barbera, A. Rodriguez-Rojas, F. Garcia, P. Fuentes-Prior, F. Arnalich, and E. Lopez-Collazo. 2007. Inflammatory responses associated with acute coronary syndrome up-regulate IRAK-M and induce endotoxin tolerance in circulating monocytes. *J Endotoxin Res* 13:39-52.
45. Gomez-Pina, V., A. Soares-Schanoski, A. Rodriguez-Rojas, C. Del Fresno, F. Garcia, M. T. Vallejo-Cremades, I. Fernandez-Ruiz, F. Arnalich, P. Fuentes-Prior, and E. Lopez-Collazo. 2007. Metalloproteinases shed TREM-1 ectodomain from lipopolysaccharide-stimulated human monocytes. *J Immunol* 179:4065-4073.
46. Gonzalez-Leon, M. C., A. Soares-Schanoski, C. del Fresno, A. Cimadevila, V. Gomez-Pina, E. Mendoza-Barbera, F. Garcia, E. Marin, F. Arnalich, P. Fuentes-Prior, and E. Lopez-Collazo. 2006. Nitric oxide induces SOCS-1 expression in human monocytes in a TNF-alpha-dependent manner. *J Endotoxin Res* 12:296-306.
47. Lopez-Collazo, E., P. Fuentes-Prior, F. Arnalich, and C. del Fresno. 2006. Pathophysiology of interleukin-1 receptor-associated kinase-M: implications in refractory state. *Curr Opin Infect Dis* 19:237-244.
48. Soares-Schanoski, A., V. Gomez-Pina, C. del Fresno, A. Rodriguez-Rojas, F. Garcia, A. Glaria, M. Sanchez, M. T. Vallejo-Cremades, R. Baos, P. Fuentes-Prior, F. Arnalich, and E. Lopez-Collazo. 2007. 6-Methylprednisolone down-regulates IRAK-M in human and murine osteoclasts and boosts bone-resorbing activity: a putative mechanism for corticoid-induced osteoporosis. *J Leukoc Biol* 82:700-709.
49. Escoll, P., C. del Fresno, L. Garcia, G. Valles, M. J. Lendinez, F. Arnalich, and E. Lopez-Collazo. 2003. Rapid up-regulation of IRAK-M expression following

- a second endotoxin challenge in human monocytes and in monocytes isolated from septic patients. *Biochem Biophys Res Commun* 311:465-472.
50. Martin, M., G. F. Bol, A. Eriksson, K. Resch, and R. Brigelius-Flohe. 1994. Interleukin-1-induced activation of a protein kinase co-precipitating with the type I interleukin-1 receptor in T cells. *Eur J Immunol* 24:1566-1571.
 51. Janssens, S., and R. Beyaert. 2003. Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. *Mol Cell* 11:293-302.
 52. Kawagoe, T., S. Sato, K. Matsushita, H. Kato, K. Matsui, Y. Kumagai, T. Saitoh, T. Kawai, O. Takeuchi, and S. Akira. 2008. Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2. *Nat Immunol* 9:684-691.
 53. Meylan, E., and J. Tschopp. 2008. IRAK2 takes its place in TLR signaling. *Nat Immunol* 9:581-582.
 54. Kobayashi, K., L. D. Hernandez, J. E. Galan, C. A. Janeway, Jr., R. Medzhitov, and R. A. Flavell. 2002. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* 110:191-202.
 55. Li, H., E. Cuartas, W. Cui, Y. Choi, T. D. Crawford, H. Z. Ke, K. S. Kobayashi, R. A. Flavell, and A. Vignery. 2005. IL-1 receptor-associated kinase M is a central regulator of osteoclast differentiation and activation. *J Exp Med* 201:1169-1177.
 56. Huang, Y. S., A. Misior, and L. W. Li. 2005. Novel role and regulation of the interleukin-1 receptor associated kinase (IRAK) family proteins. *Cell Mol Immunol* 2:36-39.
 57. Phillips, R. E. 2002. Immunology taught by Darwin. *Nat Immunol* 3:987-989.
 58. Kim, D., T. Hoory, A. Monie, J. P. Ting, C. F. Hung, and T. C. Wu. 2008. Enhancement of DNA vaccine potency through coadministration of CIITA DNA with DNA vaccines via gene gun. *J Immunol* 180:7019-7027.
 59. Chang, Y. C., T. C. Chen, C. T. Lee, C. Y. Yang, H. W. Wang, C. C. Wang, and S. L. Hsieh. 2008. Epigenetic control of MHC class II expression in tumor-associated macrophages by decoy receptor 3. *Blood* 111:5054-5063.
 60. Torre-Amione, G., R. D. Beauchamp, H. Koeppen, B. H. Park, H. Schreiber, H. L. Moses, and D. A. Rowley. 1990. A highly immunogenic tumor transfected

- with a murine transforming growth factor type beta 1 cDNA escapes immune surveillance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:1486-1490.
61. Schnurr, M., Q. Chen, A. Shin, W. Chen, T. Toy, C. Jenderek, S. Green, L. Miloradovic, D. Drane, I. D. Davis, J. Villadangos, K. Shortman, E. Maraskovsky, and J. Cebon. 2005. Tumor antigen processing and presentation depend critically on dendritic cell type and the mode of antigen delivery. *Blood* 105:2465-2472.
 62. Biswas, S. K., L. Gangi, S. Paul, T. Schioppa, A. Saccani, M. Sironi, B. Bottazzi, A. Doni, B. Vincenzo, F. Pasqualini, L. Vago, M. Nebuloni, A. Mantovani, and A. Sica. 2006. A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood* 107:2112-2122.
 63. Mytar, B., M. Woloszyn, R. Szatanek, M. Baj-Krzyworzeka, M. Siedlar, I. Ruggiero, J. Wieckiewicz, and M. Zembala. 2003. Tumor cell-induced deactivation of human monocytes. *J Leukoc Biol* 74:1094-1101.
 64. Witkop, B. 1999. Paul Ehrlich and his Magic bullets--revisited. *Proc Am Philos Soc* 143:540-557.
 65. Burnet, M. 1957. Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br Med J* 1:779-786.
 66. Shankaran, V., H. Ikeda, A. T. Bruce, J. M. White, P. E. Swanson, L. J. Old, and R. D. Schreiber. 2001. IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410:1107-1111.
 67. Shinkai, Y., G. Rathbun, K. P. Lam, E. M. Oltz, V. Stewart, M. Mendelsohn, J. Charron, M. Datta, F. Young, A. M. Stall, and et al. 1992. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68:855-867.
 68. Gabrilovich, D. 2004. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat Rev Immunol* 4:941-952.
 69. Duluc, D., Y. Delneste, F. Tan, M. P. Moles, L. Grimaud, J. Lenoir, L. Preisser, I. Anegon, L. Catala, N. Ifrah, P. Descamps, E. Gamelin, H. Gascan, M. Hebbar, and P. Jeannin. 2007. Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood* 110:4319-4330.

70. Crespi, B., and K. Summers. 2005. Evolutionary biology of cancer. *Trends Ecol Evol* 20:545-552.
71. Kaplan, D. H., V. Shankaran, A. S. Dighe, E. Stockert, M. Aguet, L. J. Old, and R. D. Schreiber. 1998. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7556-7561.
72. Robinson-Smith, T. M., I. Isaacsohn, C. A. Mercer, M. Zhou, N. Van Rooijen, N. Husseinazadeh, M. M. McFarland-Mancini, and A. F. Drew. 2007. Macrophages mediate inflammation-enhanced metastasis of ovarian tumors in mice. *Cancer Res* 67:5708-5716.
73. Ness, R. B., and F. Modugno. 2006. Endometriosis as a model for inflammation-hormone interactions in ovarian and breast cancers. *Eur J Cancer* 42:691-703.
74. Hagemann, T., J. Wilson, F. Burke, H. Kulbe, N. F. Li, A. Pluddemann, K. Charles, S. Gordon, and F. R. Balkwill. 2006. Ovarian cancer cells polarize macrophages toward a tumor-associated phenotype. *J Immunol* 176:5023-5032.
75. Xie, Q., L. Gan, J. Wang, I. Wilson, and L. Li. 2007. Loss of the innate immunity negative regulator IRAK-M leads to enhanced host immune defense against tumor growth. *Mol Immunol* 44:3453-3461.
76. Eichler, G. S., S. Huang, and D. E. Ingber. 2003. Gene Expression Dynamics Inspector (GEDI): for integrative analysis of expression profiles. *Bioinformatics* 19:2321-2322.
77. Guo, Y., G. S. Eichler, Y. Feng, D. E. Ingber, and S. Huang. 2006. Towards a holistic, yet gene-centered analysis of gene expression profiles: a case study of human lung cancers. *J Biomed Biotechnol* 2006:69141.
78. Gosain, A., K. Muthu, R. L. Gamelli, and L. A. DiPietro. 2007. Norepinephrine suppresses wound macrophage phagocytic efficiency through alpha- and beta-adrenoreceptor dependent pathways. *Surgery* 142:170-179.
79. Pinheiro da Silva, F., M. Aloulou, D. Skurnik, M. Benhamou, A. Andremont, I. T. Velasco, M. Chiamolera, J. S. Verbeek, P. Launay, and R. C. Monteiro. 2007. CD16 promotes Escherichia coli sepsis through an FcR gamma inhibitory pathway that prevents phagocytosis and facilitates inflammation. *Nat Med* 13:1368-1374.
80. Adams, A. B., T. C. Pearson, and C. P. Larsen. 2003. Heterologous immunity: an overlooked barrier to tolerance. *Immunol Rev* 196:147-160.

81. Mantovani, A., A. Sica, and M. Locati. 2007. New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur J Immunol* 37:14-16.
82. Brown, M. A., D. Metcalf, and N. M. Gough. 1994. Leukaemia inhibitory factor and interleukin 6 are expressed at very low levels in the normal adult mouse and are induced by inflammation. *Cytokine* 6:300-309.
83. Dower, K., D. K. Ellis, K. Saraf, S. A. Jelinsky, and L. L. Lin. 2008. Innate immune responses to TREM-1 activation: overlap, divergence, and positive and negative cross-talk with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 180:3520-3534.
84. Ho, C. C., W. Y. Liao, C. Y. Wang, Y. H. Lu, H. Y. Huang, H. Y. Chen, W. K. Chan, H. W. Chen, and P. C. Yang. 2008. TREM-1 expression in tumor-associated macrophages and clinical outcome in lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 177:763-770.
85. Greten, F. R., L. Eckmann, T. F. Greten, J. M. Park, Z. W. Li, L. J. Egan, M. F. Kagnoff, and M. Karin. 2004. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 118:285-296.
86. Qing, G., and G. Xiao. 2005. Essential role of IkappaB kinase alpha in the constitutive processing of NF-kappaB2 p100. *J Biol Chem* 280:9765-9768.
87. Basak, S., H. Kim, J. D. Kearns, V. Tergaonkar, E. O'Dea, S. L. Werner, C. A. Benedict, C. F. Ware, G. Ghosh, I. M. Verma, and A. Hoffmann. 2007. A fourth IkappaB protein within the NF-kappaB signaling module. *Cell* 128:369-381.
88. Wang, H., and M. Xing. 2001. [Actin is located in the nucleus and nuclear matrix of HeLa cells]. *Yi Chuan Xue Bao* 28:211-216.
89. Wang, G., G. T. Cantin, J. L. Stevens, and A. J. Berk. 2001. Characterization of mediator complexes from HeLa cell nuclear extract. *Mol Cell Biol* 21:4604-4613.
90. Shabo, I., O. Stal, H. Olsson, S. Dore, and J. Svanvik. 2008. Breast cancer expression of CD163, a macrophage scavenger receptor, is related to early distant recurrence and reduced patient survival. *Int J Cancer* 123:780-786.
91. Grage-Griebenow, E., H. D. Flad, M. Ernst, M. Bzowska, J. Skrzeczynska, and J. Pryjma. 2000. Human MO subsets as defined by expression of CD64 and CD16 differ in phagocytic activity and generation of oxygen intermediates. *Immunobiology* 202:42-50.
92. Hansen, B. D., H. Schmidt, H. von der Maase, P. Sjoegren, R. Agger, and M. Hokland. 2006. Tumour-associated macrophages are related to progression in

- patients with metastatic melanoma following interleukin-2 based immunotherapy. *Acta Oncol* 45:400-405.
93. Ioan-Facsinay, A., S. J. de Kimpe, S. M. Hellwig, P. L. van Lent, F. M. Hofhuis, H. H. van Ojik, C. Sedlik, S. A. da Silveira, J. Gerber, Y. F. de Jong, R. Roozendaal, L. A. Aarden, W. B. van den Berg, T. Saito, D. Mosser, S. Amigorena, S. Izui, G. J. van Ommen, M. van Vugt, J. G. van de Winkel, and J. S. Verbeek. 2002. FcγRI (CD64) contributes substantially to severity of arthritis, hypersensitivity responses, and protection from bacterial infection. *Immunity* 16:391-402.
 94. Hernandez-Fuentes, M. P., A. N. Warrens, and R. I. Lechler. 2003. Immunologic monitoring. *Immunol Rev* 196:247-264.
 95. Nakano, Y., E. Kuroda, T. Kito, A. Yokota, and U. Yamashita. 2006. Induction of macrophagic prostaglandin E2 synthesis by glioma cells. *J Neurosurg* 104:574-582.
 96. Klimp, A. H., H. Hollema, C. Kempinga, A. G. van der Zee, E. G. de Vries, and T. Daemen. 2001. Expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in human ovarian tumors and tumor-associated macrophages. *Cancer Res* 61:7305-7309.
 97. Leek, R. D., C. E. Lewis, R. Whitehouse, M. Greenall, J. Clarke, and A. L. Harris. 1996. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res* 56:4625-4629.
 98. Pikarsky, E., R. M. Porat, I. Stein, R. Abramovitch, S. Amit, S. Kasem, E. Gutkovich-Pyest, S. Urieli-Shoval, E. Galun, and Y. Ben-Neriah. 2004. NF-κB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 431:461-466.
 99. Balkwill, F. 2002. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? *Cytokine Growth Factor Rev* 13:135-141.
 100. El Kasmi, K. C., A. M. Smith, L. Williams, G. Neale, A. D. Panopoulos, S. S. Watowich, H. Hacker, B. M. Foxwell, and P. J. Murray. 2007. Cutting edge: A transcriptional repressor and corepressor induced by the STAT3-regulated anti-inflammatory signaling pathway. *J Immunol* 179:7215-7219.
 101. Rabe, B., A. Chalaris, U. May, G. H. Waetzig, D. Seegert, A. S. Williams, S. A. Jones, S. Rose-John, and J. Scheller. 2008. Transgenic blockade of interleukin 6 transsignaling abrogates inflammation. *Blood* 111:1021-1028.

102. Fan, Y., J. Ye, F. Shen, Y. Zhu, Y. Yeghiazarians, W. Zhu, Y. Chen, M. T. Lawton, W. L. Young, and G. Y. Yang. 2008. Interleukin-6 stimulates circulating blood-derived endothelial progenitor cell angiogenesis in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:90-98.
103. Zou, W. 2005. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer* 5:263-274.
104. Wang, T., G. Niu, M. Kortylewski, L. Burdelya, K. Shain, S. Zhang, R. Bhattacharya, D. Gabrilovich, R. Heller, D. Coppola, W. Dalton, R. Jove, D. Pardoll, and H. Yu. 2004. Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med* 10:48-54.
105. Sica, A., T. Schioppa, A. Mantovani, and P. Allavena. 2006. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* 42:717-727.
106. Metcalf, D. 2003. The unsolved enigmas of leukemia inhibitory factor. *Stem Cells* 21:5-14.
107. van 't Veer, C., P. S. van den Pangaart, M. A. van Zoelen, M. de Kruif, R. S. Birjmohun, E. S. Stroes, A. F. de Vos, and T. van der Poll. 2007. Induction of IRAK-M is associated with lipopolysaccharide tolerance in a human endotoxemia model. *J Immunol* 179:7110-7120.
108. Saccani, A., T. Schioppa, C. Porta, S. K. Biswas, M. Nebuloni, L. Vago, B. Bottazzi, M. P. Colombo, A. Mantovani, and A. Sica. 2006. p50 nuclear factor-kappaB overexpression in tumor-associated macrophages inhibits M1 inflammatory responses and antitumor resistance. *Cancer Res* 66:11432-11440.
109. Li, Q., S. Withoff, and I. M. Verma. 2005. Inflammation-associated cancer: NF-kappaB is the lynchpin. *Trends Immunol* 26:318-325.
110. Klesney-Tait, J., I. R. Turnbull, and M. Colonna. 2006. The TREM receptor family and signal integration. *Nat Immunol* 7:1266-1273.
111. Gibot, S., C. Alauzet, F. Massin, N. Sennoune, G. C. Faure, M. C. Bene, A. Lozniewski, P. E. Bollaert, and B. Levy. 2006. Modulation of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 pathway during pneumonia in rats. *J Infect Dis* 194:975-983.
112. Skrzeczynska-Moncznik, J., M. Bzowska, S. Loseke, E. Grage-Griebenow, M. Zembala, and J. Pryjma. 2008. Peripheral blood CD14^{high} CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. *Scand J Immunol* 67:152-159.

113. Komohara, Y., J. Hirahara, T. Horikawa, K. Kawamura, E. Kiyota, N. Sakashita, N. Araki, and M. Takeya. 2006. AM-3K, an anti-macrophage antibody, recognizes CD163, a molecule associated with an anti-inflammatory macrophage phenotype. *J Histochem Cytochem* 54:763-771.
114. Hintz, K. A., A. J. Rassias, K. Wardwell, M. L. Moss, P. M. Morganelli, P. A. Pioli, A. L. Givan, P. K. Wallace, M. P. Yeager, and P. M. Guyre. 2002. Endotoxin induces rapid metalloproteinase-mediated shedding followed by up-regulation of the monocyte hemoglobin scavenger receptor CD163. *J Leukoc Biol* 72:711-717.
115. Varga, G., J. Ehrchen, A. Tsianakas, K. Tenbrock, A. Rattenholl, S. Seeliger, M. Mack, J. Roth, and C. Sunderkoetter. 2008. Glucocorticoids induce an activated, anti-inflammatory monocyte subset in mice that resembles myeloid-derived suppressor cells. *J Leukoc Biol* 84:644-650.
116. Zheng, Y., C. N. Manzotti, M. Liu, F. Burke, K. I. Mead, and D. M. Sansom. 2004. CD86 and CD80 differentially modulate the suppressive function of human regulatory T cells. *J Immunol* 172:2778-2784.
117. Kaneko, T., T. Okiji, R. Kaneko, J. E. Nor, and H. Suda. 2008. Antigen-presenting cells in human radicular granulomas. *J Dent Res* 87:553-557.
118. Krawczyk, M., Q. Seguin-Estevez, E. Leimgruber, P. Sperisen, C. Schmid, P. Bucher, and W. Reith. 2008. Identification of CIITA regulated genetic module dedicated for antigen presentation. *PLoS Genet* 4:e1000058.
119. Dunn, G. P., L. J. Old, and R. D. Schreiber. 2004. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21:137-148.
120. Munn, D. H., and N. K. Cheung. 1990. Phagocytosis of tumor cells by human monocytes cultured in recombinant macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 172:231-237.
121. O'Keefe, G. M., V. T. Nguyen, and E. N. Benveniste. 1999. Class II transactivator and class II MHC gene expression in microglia: modulation by the cytokines TGF-beta, IL-4, IL-13 and IL-10. *Eur J Immunol* 29:1275-1285.

6.1 Artículos publicados durante el desarrollo del presente trabajo

del Fresno C., V. Gómez-Piña , V. Lores , **A. Soares-Schanoski** , I. Fernández-Ruiz , B. Rojo , R. Alvarez-Sala , E. Caballero-Garrido , F. García , T. Veliz , F. Arnalich , P. Fuentes-Prior , F. García-Río , E. Lopez-Collazo. 2008. Monocytes from cystic fibrosis patients are locked in an LPS tolerance state: down-regulation of TREM-1 as putative underlying mechanism. *Plos One* 16: 16;3(7):e2667.

Bru, A., C. del Fresno, **A. Soares-Schanoski**, S. Albertos, I. Bru, A. Porres, E. Rollan-Landeras, A. Dopazo, D. Casero, V. Gomez-Pina, L. Garcia, F. Arnalich, R. Alvarez, A. Rodriguez-Rojas, P. Fuentes-Prior, and E. Lopez-Collazo. 2007. Position-dependent expression of GADD45alpha in rat brain tumours. *Med Oncol* 24:436-444.

del Fresno, C., L. Soler-Rangel, **A. Soares-Schanoski**, V. Gomez-Pina, M. C. Gonzalez-Leon, L. Gomez-Garcia, E. Mendoza-Barbera, A. Rodriguez-Rojas, F. Garcia, P. Fuentes-Prior, F. Arnalich, and E. Lopez-Collazo. 2007. Inflammatory responses associated with acute coronary syndrome up-regulate IRAK-M and induce endotoxin tolerance in circulating monocytes. *J Endotoxin Res* 13:39-52.

Gomez-Pina, V., **A. Soares-Schanoski**, A. Rodriguez-Rojas, C. Del Fresno, F. Garcia, M. T. Vallejo-Cremades, I. Fernandez-Ruiz, F. Arnalich, P. Fuentes-Prior, and E. Lopez-Collazo. 2007. Metalloproteinases shed TREM-1 ectodomain from lipopolysaccharide-stimulated human monocytes. *J Immunol* 179:4065-4073.

Soares-Schanoski, A., V. Gomez-Pina, C. del Fresno, A. Rodriguez-Rojas, F. Garcia, A. Glaria, M. Sanchez, M. T. Vallejo-Cremades, R. Baos, P. Fuentes-Prior, F. Arnalich, and E. Lopez-Collazo. 2007. 6-Methylprednisolone down-regulates IRAK-M in human and murine osteoclasts and boosts bone-resorbing activity: a putative mechanism for corticoid-induced osteoporosis. *J Leukoc Biol* 82:700-709.

Gonzalez-Leon, M. C., **A. Soares-Schanoski**, C. del Fresno, A. Cimadevila, V. Gomez-Pina, E. Mendoza-Barbera, F. Garcia, E. Marin, F. Arnalich, P. Fuentes-Prior, and E. Lopez-Collazo. 2006. Nitric oxide induces SOCS-1 expression in human monocytes in a TNF-alpha-dependent manner. *J Endotoxin Res* 12:296-306.

